UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1968-1969

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série E N° 188

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

Claude, Monique CHOISY, née RENARD

Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Assistante à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Reims

Première Thèse

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DES PLAGES SUR CULTURES DE FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE POULET APPLICATION A L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE QUELQUES SUBSTANCES

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 6 Mai 1969

JURY

Mlle S. LAMBIN..... Président
M. A GERMAN ..
M. J. DUCHENNE } Examinateurs
M. G. DROPSY...

IMPRIMERIE SCHIRM & GAMA - REIMS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538115_0024

UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1968-1969

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série E N° 188

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

Claude, Monique CHOISY, née RENARD

Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Assistante à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Reims

Première Thèse

ÉTUDE DE LA MÉTHODE DES PLAGES SUR CULTURES DE FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE POULET APPLICATION A L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE QUELQUES SUBSTANCES

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 6 Mai 1969

JURY

Mlle S. LAMBIN..... Président
M. A GERMAN ..
M. J. DUCHENNE } Examinateurs
M. G. DROPSY...

IMPRIMERIE SCHIRM & GAMA - REIMS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.	DOYEN
M. GUILLOT M. O +	Assesseur
M. DELAVEAU P.	Assesseur
M. RODINEAU L. +	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.	Attaché principal A. U.
M. JEANDEL	Attaché A. U.
Mme ESPINASSE M. L.	Attaché A. U.
M. BRENN A.	Attaché A. U.
M. JACOB A.	Attaché A. U.
Mme MUR A. M.	Attaché A. U.
Melle FRIZOL E.	Attaché A. U.
M. TRIGAN J. N.	Attaché A. U.

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L.	O +
M. FLEURY P.	O +
M. PICON M.	O +

PROFESSEURS

M. JANOT M.-M.	O+ Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O+	Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O+	Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O+	Physique (T)
M. GAUTIER J. A.	O+	Chimie Organique (T)
Melle LAMBIN S.	O+	Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M. COURTOIS J. E.	+	Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L.	O+	Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O+ Membre de l'Institut	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+	Hydrologie (T)

M. CAVIER R. +	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A. +	Hygiène et éducation Sanitaire (T)
M. MOREAU R. +	Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.	Microbiologie (T)
M. PIETTE M. +	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M. +	Biochimie Appliquée (T)
M. DELLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G. +	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
M. RENAULT J.	Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T
M. LARUELLE P.	Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
M. DELAVEAU P.	Séméiologie et Pathologie Générale (T
M. COHEN Y.	Pharmacodynamie
M. RENAULT H.	Physique
M. BOURDON R.	Chimie Analytique
M. REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.	Toxicologie
M. POISSON J.	Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.	Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.	Hématologie
M. PERCHERON F.	Chimie Biologique
M. SAVEL J.	Biologie Animale

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.	Toxicologie
M. DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
M. BORY J.	Microbiologie
M. MIOCQUE M.	Chimie Organique
M. GUIGNARD J. L.	Botanique Générale
M. GOUNELLE J. C.	Physiologie
M. BINET P.	Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.	Chimie Organique
Mme PLAT M.	Législation et Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
M. DUCHON D'ENGENIERES M.	Chimie Organique
M. ADOLPHE C.	Physique
M. GUERNET M.	Chimie Analytique
M. DIDRY J. R.	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales
M. KHODADAD P.	Chimie Minérale
M. PUISIEUX F.	Pharmacie Galénique
M. GUERIN H. Chargé de cours	Matière Médicale
M. PERLES R. (dél.)	Chimie Biologique
M. YONGER J. (dél.)	Chimie Analytique
M. MESTRE J. (dél.)	Botanique
M. RIVET J. (dél.)	Chimie Générale et Minérale
M. HAZEBROUCQ G. (dél.)	Physique
M. BOURRINET P. (dél.)	Hygiène
M. ETIENNE J. (dél.)	Mathématiques
M. SOULEAU Ch. (dél.)	Chimie Générale et Minérale
M. HAMON M. (dél.)	Chimie Analytique
M. AGNERAY J. (dél.)	Biologie
M. DREUX C. (dél.)	Biochimie Appliquée
M. ROUSSELET F. (dél.)	Chimie Analytique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P. +

M. GUERIN H. +

Mme HARISPE M.

Melle LONGUEVALLE S.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

(Liste alphabétique)

M. ADAM Yves	T. P. Pharmacie Chimique 5ème A.
M. AYMARD Pierre	E. D. Physiologie
Melle BARNIER Suzanne (dél.)	Mathématiques
Melle BERNARD Jacqueline	Bactériologie 5ème A.
M. BESANCON Pierre (dél.)	Mathématiques
Mme BLANC Jeanine	E. D. Chimie Organique 1ère A.
Mme DONALY Jacqueline (dél.)	E. D. Botanique 1ère A.
Melle BOURNIQUE Claude	T. P. Physiologie Végétale
M. BRALET Michel (dél.)	E. D. Zoologie 1ère A.
M. CANAL Jacques (dél.)	Biochimie Appliquée 5ème A.
M. CARLIER Alain	C. E. S. Pharmacie Galénique Industrielle
M. CARRE Daniel (dél.)	Mathématiques
Melle CARRERE Clotilde	T. P. Microbiologie 4ème A.
Mme CERAC Jacqueline	C. E. S. Parasitologie
M. CERCEAU Henri (dél.)	E. D. Chimie Minérale 1ère A.
Mme CHARPENTIER Madeleine	E. D. Chimie Générale et Minérale
M. CHERON J. Marie (dél.)	T. P. Chimie Biologique
Melle CHOIX Marguerite	T. P. Pharmacie Galénique
Melle CLAIR Geneviève	E. D. Essais Médicaments Végétaux
M. DAGRON Christian	E. D. Chimie Générale et Minérale
M. DAVY Jean (dél.)	C. E. S. Biochimie
Melle DECAUDIN M. Thérèse	T. P. Parasitologie 4ème A.
M. DELATTRE Jacques (dél.)	Biochimie Appliquée 5ème A.
M. DELCOURT Alain (dél.)	E. D. Botanique
M. DOUSSIN Alexandre	T. P. Chimie Analytique 5ème A.

Melle DUMANT Geneviève	C. E. S. Contrôle Médicaments (Physico-Chim.)
Mme DUPONT Charlotte	T. P. Pharmacodynamie
M. ETIENNE Guy	T. P. Pharmacie Galénique
Mme FAURE Liliane	E. D. Chimie Organique
Melle FLEURY Solange	E. D. Chimie Analytique Quantitative 2ème A.
Melle FOGLIETTI Anne-Marie	T. P. Chimie Biologique
M. GIRARDEAU François (dél.)	T. P. Chimie Organique 5ème A.
M. GOBERT Jean (dél.)	T. P. Zoologie 1ère A.
Melle GOURSAT Marie-José	E. D. Botanique 1ère A.
M. GROSSIORD J. Louis (dél.)	T. P. Physique 1ère A.
Melle GUILLOUX Edith (dél.)	T. P. Chimie Biologique
M. HARISPE Jean +	T. P. Chimie Organique 2ème A.
M. HENRY Jacques	Essais Médicaments Chimiques et Géléniques
Mme HUBERT Jeanne	C. E. S. Bactériologie, Immunologie
Mme JULIEN Maud	E. D. Physique 2 ème A.
M. JULIEN René	E. D. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
Melle JUND Yvonne	C. E. S. Microbiologie, Bactériologie
M. LALLEGERIE Pierre (dél.)	C. E. S. Biochimie
M. LAROCHE Jacques	Hygiène Education Sanitaire
M. LEBOEUF Michel	C. E . S. Pharmacotechnie Galénique
Mme LEDUC Yvette	Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE Lucien (dél.)	T. P. Chimie Organique 2ème A.
Mme LEGER Nicole	Parasitologie 5ème A.
M. LELUAN Georges	Bactériologie C. E. S.
M. LELUC Robert	T. P. Microbiologie 5ème A. et Biologie
M. LIMAY René	Législation
M. LEMONNIER Alain	T. P. Chimie Analytique Quantitative
M. LEPAREUR Christian (dél.)	Mathématiques
Mme LEQUANG Thuan (dél.)	T. P. Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN Pierre	E. D. Chimie Analytique 1ère A.
Mme LEVY Françoise (dél.)	E. D. Botanique 2ème A.

M. LIKFORMAN Joseph	E. D. Physique 1ère A.
Melle LONGEVIALLE Monique	E. D. Botanique 1ère A.
M. MACCARIO Jean (dél.)	Mathématiques
M. MAHUZIER Georges	T. P. Chimie Analytique Qualitative
M. MANDEREAU Jean	C. E. S. Pharmacotechnie Chimique
M. MANET Léon	Chimie Biologique C. E. S.
M. MARTIN FRERE Henry	T. P. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
M. MAUGUEN Yves (dél.)	Mathématiques
Melle MICHELET Annick	E. D. Chimie Générale et Minérale 2ème A.
Melle MORIN Hélène	C. E. S. Pharmacodynamie
Mme MOURY Jacqueline (dél.)	T. P. Zoologie 1ère A.
M. N'GUYEN Phu Lich (dél.)	C. E. S. Toxicologie
Mme NOTTEGHEM M. Jacqueline	T. P. Parasitologie 4ème A.
Mme PANOUSE Jacqueline	Microbiologie et Virologie C. E. S.
Mme PAOLAGGI Françoise	C. E. S. Electrochimie
M. PARIS Michel	C. E. S. Contrôle Médicaments (Biologie)
M. PESTIS Jean	T. P. Anatomie Physiologie Humaines
Mme PIETTE Colette	Hématologie Biologie 5ème A.
M. POULLAIN Pierre	C. E. S. Hématologie
M. POUSSET Jean-Louis	Chimie Extractive
M. QUENEZ Pierre	T. P. Chimie Générale et Minérale 1ère A.
Mme ROBERT Monique	C. E. S. Immunologie Microbiologie
M. RODIER Noël (dél.)	E. D. Physique 2ème A.
Melle ROLLEN Alice +	T. P. Botanique 1ère A.
Melle ROUSSELET Renée	Essais Médicaments Végétaux
Mme RUDLER M. (dél.)	E. D. Chimie Organique
Mme SALES Nicole	T. P. Physiologie
M. SCHUSTER Jean	Toxicologie 4ème et 5ème A.
Melle SORIA Claudine	Biochimie Appliquée 5ème A.
Mme SEILLER Monique	T. P. Pharmacie Galénique Industrielle
Melle STRUPLER Nicole	E. D. Chimie Générale et Minérale 1ère A.

M. THUONG CONG TRIEU	T. P. Chimie Analytique Quantitative
Melle TROUPEL Solange (dél.)	T. P. Chimie Analytique Quantitative
M. VIERFOND J. Michel	T. P. Chimie Organique 5ème A. (synthèse organique)
M. VILLERS Jacques	T. P. Physique 2ème A.
Mme WELBY Josette (dél.)	T. P. Pharmacie Galénique

BIBLIOTHEQUE

Melle RUYSSEN Y. +	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.	Conservateur
Melle BOUVRESSE A. M.	Bibliothécaire
Mme COULET M. A.	Bibliothécaire
Melle LANGLOIS C.	Bibliothécaire

Légion d'honneur : + Chevalier
O Officier
C Commandeur

A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur

Membre de l'Académie de Pharmacie

Qui a bien voulu nous faire le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

En témoignage de notre respectueuse gratitude

A Monsieur le Professeur A. GERMAN

Professeur de Virologie et Immunologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Membre de l'Académie de Pharmacie

Qui nous a accueillie dans son service de l'Hôpital de la Salpêtrière comme Interne et nous orienta vers la recherche en inspirant le sujet de cette thèse.

C'est grâce aux conseils éclairés qu'il nous a prodigués avec sa haute compétence et avec tant de bienveillance que nous avons pu persévérer dans cette tâche.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse et affectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J. DUCHENNE

Professeur sans chaire à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Reims

Biologiste au Centre Hospitalier de Montfermeil

Qui nous fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse et nous ayant choisi comme assistante de Microbiologie, nous a toujours fait profiter avec bienveillance de sa compétence et de son expérience.
Qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse gratitude et l'assurance de notre dévouement et de notre sincère admiration.

A Monsieur le Professeur G. DROPSY

Professeur de Bactériologie - Virologie - Parasitologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Reims

Biologiste au Centre Hospitalier et Universitaire de Reims

Qui après s'être intéressé à ce travail nous a fait l'honneur d'accepter de le juger.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude et de nos sentiments amicaux.

A Madame J. PANOUSE - PERRIN

Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris

En témoignage de notre vive gratitude pour l'aide bienveillante et compétente qu'elle nous a apportée tout au long de ce travail.

A tous les collaborateurs du Laboratoire de Virologie et Immunologie

Qui nous ont apporté une aide si efficace au cours de ce travail.

Qu'ils trouvent ici l'expression de nos remerciements et soient assurés de notre sincère amitié.

A nos collègues de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Reims

En témoignage de notre amitié.

A ma famille,

A mes amis,

En témoignage de mon affection.

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION

C'est au cours de notre Internat en Pharmacie, à l'Hôpital de la SALPETRIERE, que Monsieur le Professeur GERMAN, Pharmacien Chef, dirigeant les laboratoires de Biochimie et de Sérologie, nous a initiée à la Recherche et nous en a communiqué le goût.

Nous tenons à le remercier ici de nous avoir accueillie et introduite dans son équipe de travail au laboratoire de Virologie et Immunologie de la Faculté de Pharmacie.

La Recherche dans le domaine de la Virologie n'est possible qu'à l'intérieur d'une équipe unie par le même souci de rigueur dans l'élaboration des hypothèses, dans les manipulations et les observations. Cette nécessité de la formation d'une équipe est d'autant plus grande en Virologie que cette Science participe de beaucoup d'autres : Biochimie, Immunologie, Microbiologie, Toxicologie, Pharmacologie, etc..., et que les techniques utilisées sont particulièrement longues et délicates. C'est dire combien il est important que l'ensemble des chercheurs du Laboratoire soit mené avec compétence, compréhension et ténacité. Nous avons éprouvé du plaisir et de la fierté à travailler dans ces conditions sous la direction de Monsieur le Professeur GERMAN, assisté de Madame PANOUSE-PERRIN, dont le dynamisme et l'expérience nous ont souvent réconfortée.

Lorsque Monsieur GERMAN nous a confié l'étude de la méthode des Plages, de nombreux auteurs tâtonnaient à la recherche d'une technique qualitative et quantitative de mise en évidence du Pouvoir Cyto-Pathogène des Virus.

Il existait pratiquement autant de techniques que d'auteurs, et les mauvais résultats obtenus étaient attribués à une foule de facteurs que nous avons eu pour mission d'étudier et de clarifier.

Nous avons bien failli nous décourager lorsque nous avons vu se maintenir plusieurs mois le premier, et énorme obstacle à la réalisation de ce travail : nous n'obtenions des Plages qu'en petit nombre et de façon très irrégulière, ignorant l'importance qualitative et quantitative des éléments en jeu, œuf embryonné, culture cellulaire, virus, milieux de culture et bien d'autres.

Il a donc fallu reprendre le problème à la base, c'est-à-dire au niveau de la culture cellulaire. Les conseils de Monsieur HANNOUN à ce propos nous ont été des plus précieux. Nous lui devons aussi la souche virale qui nous a simplifié les premiers essais.

Ces débuts malheureux nous ont beaucoup servi par la suite, car une fois la reproductibilité de la technique assurée, nous avons désiré connaître la cause de cet insuccès. Nous avons ainsi découvert quelques facteurs d'inhibition de la formation des Plages : culture cellulaire insuffisante, température de formation, présence d'inhibiteur dans la gélose. A partir de ce moment, nous avons pu étudier pas à pas toutes les étapes techniques de l'obtention des Plages.

On sait que les virus se multiplient d'autant mieux que la cellule pénétrée est elle-même jeune, voire en voie de multiplication. Or les Plages formées, notre culture mourait assez rapidement. Divers auteurs ayant publié quelques artifices pour prolonger l'aspect caractéristique des Plages sur la culture cellulaire, nous avons cherché à apporter dans le milieu nutritif solide qui recouvre les cellules la sustance qui protègerait le mieux les cellules de la dégénérescence.

Nous avions fondé de grands espoirs sur l'acide oxalacétique, plaque tournante de nombreux métabolismes cellulaires dont la présence dans le milieu de culture nous semblait au moins aussi physiologique que celle du bicarbonate de Sodium, couramment utilisé en Virologie.

Paradoxalement, c'est un produit étranger au métabolisme cellulaire, le TRIS (tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane), utilisé comme alcalinisant en réanimation humaine, qui nous a fourni les meilleurs résultats.

Le rôle des facteurs inhibant ou favorisant la formation des Plages une fois délimité, nous disposions d'une méthode relativement simple et parfaitement reproductible qualitativement et quantitativement. Elle était donc utilisable dans

divers domaines.

Monsieur GERMAN, aidé de ses collaborateurs, s'intéressait à l'étude des substances antivirales depuis plusieurs années déjà (81, 82, 83, 84). Plusieurs Thèses ont été élaborées dans son Laboratoire qui envisageaient cette étude sous des aspects divers : toxicité pour la cellule hôte et le virus (161), activité sur les bactériophages (262), production et activité de l'interféron (166, 181).

Nous avons donc appliqué notre méthode à l'étude de quelques substances antivirales, soit dèjà étudiées par d'autres chercheurs du Laboratoire avec des méthodes différentes, soit des substances plus nouvellement synthétisées. Ces substances ont été étudiées pour la plupart vis à vis d'un virus à ARN, le virus SINDBIS, et d'un virus à ADN, le virus de la Vaccine. Dans les deux cas, nous avons cherché à dissocier l'effet virulicide de l'effet virustatique, ce dernier étant évidemment le plus recherché en thérapeutique humaine des affections virales.

Dans le but de comparer le mode d'action de ces substances, nous les avons aussi essayées "IN OVO". Ces essais "IN OVO" parfois décevants parfois particulièrement intéressants nous ont montré combien il était difficile de passer de l'étude "IN VITRO" à l'étude "IN VIVO". Comme le note BUTHALA (34) dans un remarquable exposé sur les méthodes actuelles d'exploration de l'activité antivirale d'une sustance, il n'y a aucune commune mesure entre les produits actifs "IN VITRO" et "IN VIVO", ni dans le domaine des doses actives, ni peut être dans le mode d'activité, le métabolisme de l'organisme vivant tout entier étant inévitablement plus complexe que celui de cellules isolées.

Dans l'exposé de notre travail, nous avons adopté le plan suivant :

PLAN

PREMIERE PARTIE

METHODE D'OBTENTION DES PLAGES

I. Description sommaire du principe général.

II. Culture cellulaire des fibroblastes d'Embryons de Poulet.

1. Choix et préparation des embryons
2. Trypsination :
   - Préparation et concentration de la trypsine
   - Durée de la trypsination
   - Température
3. Mise en culture des cellules

III. Milieu de culture de la couche cellulaire.

Addition de :

- Bicarbonate de Sodium
- Acide oxalacétique
- Tris
- Gaz carbonique
- Sérum de Veau.

IV. Résultats comparés des différents milieux de culture cellulaire.

V. Inoculation du Virus.

1. Entretien de la souche de virus SINDBIS
2. Volume de l'inoculum et inoculation
3. Temps d'incubation.

VI. Milieu solide.

1. Milieu nutritif liquide : nécessité d'enrichissement par
   - Extrait embryonnaire
   - Vitamines
2. Comparaison des résultats obtenus avec
   - Le bicarbonate
   - Le Tris
   - L'acide oxalacétique avec ou sans gaz carbonique.
3. Milieu gélifiant. Utilisation de :
   - Gélose
   - Agarose

- Méthyl-Cellulose
- Amidon

VII. Obtention des Plages.

- Mise en évidence des Plages par un colorant
- Amélioration du contraste
- Température de formation
- Temps d'incubation.

VIII. Lecture des résultats.

IX. Conclusion : Méthode définitivement adoptée.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DE NOTRE METHODE A L'ETUDE DE QUELQUES SUBSTANCES ANTIVIRALES

TECHNIQUES IN VITRO

I. Généralités :

1. Souches virales
   - SINDBIS
   - VACCINE
2. Substances antivirales : mise en solution
3. Influence du solvant

II. Activité virulicide :

Essais de contact

III. Activité virustatique :

Essais de protection.

IV. Antibiogramme :

Disques

Cylindres.

V. Gradient de concentration :

Activité limite.

TECHNIQUES IN OVO

I. Activité virulicide.

II. Activité virustatique.

SUBSTANCES ANTIVIRALES

I. Essai de classification.

II. Les Enzymes.

III. Les Antibiotiques.

IV. Les Antimétabolites.

- Analogues des acides aminés
- Analogues des bases pyrimidiques :

  Pyrimidines halogénées et Azapyrimidines.
- Analogues du pentose

V. Inhibiteurs des acides nucléïques autres que les antimétabolites.

- Dérivés du Benzimidazole
- Dérivés de la guanidine
- L'Amantadine

VI. Dérivés des substances antibactériennes

- Uréthane
- Méthyl-Isatine-thio-semi-carbazone
- Glyoxal
- Glutaraldéhyde
- Quinones

VII. Conclusion.

CHAPITRE I

CULTURE CELLULAIRE D'EMBRYONS DE POULET EN VUE DE L'OBTENTION DE PLAGES AVEC UN VIRUS CYTOPATHOGENE LE VIRUS SINDBIS

METHODES GENERALES

Nous avons délibérément choisi la technique de culture cellulaire en couche unicellulaire plutôt que celle des cellules suspendues dans la gélose. Cette dernière méthode en effet, proposée par divers auteurs, en particulier par COOPER (48), BROWN et OFFICER (24) et BROWN (25) demande une quantitié de cellules,donc d'embryons, double de celle nécessaire à la première méthode.

Pour des essais de routine nous avons préféré nous attacher à étudier la technique la plus facile à réaliser, demandant le minimum de matériel, de matière première vivante et de manipulations.

Nous avons utilisé des embryons de Poulet de race Leghorn blanche après incubation de 11 jours. La tête, les pattes et les viscères sont éliminés et les corps embryonnaires sont lavés avec du liquide de HANKS additionné d'antibiotiques, puis hachés. Les morceaux sont encore lavés au liquide de HANKS puis ils sont soumis à l'action d'une solution de trypsine à 1 ‰ dans du liquide de HANKS à raison de 5 ml par embryon pendant une demi-heure à l'étuve à 37° C sur un agitateur magnétique. Après une courte décantation, le liquide surnageant est prélevé et conservé dans un bac à glace de façon à ce que la température ne monte pas au dessus de + 2° C. Une nouvelle solution de trypsine préalablement réchauffée à 37°C est ajoutée aux corps embryonnaires et la digestion se poursuit pendant encore 2 heures à la température du laboratoire sur agitateur magnétique. Au bout de ce temps, on a obtenu une suspension cellulaire homogène. Les deux suspensions sont réunies et filtrées sur gaze deux fois de suite. Le filtrat est centrifugé 5 mn à 1 000 t/mn. Le culot est lavé deux fois successivement avec du liquide de HANKS. Enfin le culot est repris dans le milieu de culture choisi (hydrolysat de caséine) additionné de 10 % de sérum de veau, à raison de 1 ml de milieu par embryon.

On procède ensuite à la numération des cellules. La suspension cellulaire doit contenir finalement 2.000.000 de cellules par ml. Cette suspension est répartie dans les flacons appropriés, par exemple : 10 ml pour des flacons de 90 ml bouchés au bouchon de caoutchouc. La culture est ensuite portée 24 heures à l'étuve à + 37° C ; on obtient un film unicellulaire continu.

Avant d'introduire d'inoculum de virus dans la culture cellulaire, il est nécessaire de laver soigneusement celle-ci avec du liquide de HANK'S à 2 reprises. Le virus est ensuite réparti sous un volume de 1 ml puis incubé à + 37° C le temps nécessaire à sa fixation sur les cellules : pour le virus SINDBIS 1 heure à + 37 ° C suffit.

On coule ensuite sur la culture un milieu gélosé de la composition suivante :

Milieu de PARKER à concentration double	1 p.
Milieu de HANK'S à concentration double	1 p.
Gélose à 30 % en eau bidistillée (au rouge neutre à 0,1 o/oo)..	2 p.
Sérum de veau	5 %
Extrait embryonnaire	2,5 %

Puis les flacons sont remis à cultiver, couche gélosée sur le dessus à l'étuve à + 37° C.

Après 48 heures, les plages sont déjà visibles. Nous les avons comptées au 3ème jour. Il ne s'en forme plus ensuite. Les plages ont été comptées à l'aide de l'appareil Visioneur-Compteur ; on peut aussi les observer sur une plaque dépolie éclairée ou sur une feuille de papier blanc. Elles apparaissent sous forme d'un trou incolore légèrement jaune sur un fond rouge uniforme tant que la culture cellulaire est vivante. Lorsque les cellules meurent, les plages deviennent moins visibles car le fond est jaune.

LIQUIDE DE HANKS

Solution saline, isotonique, tamponnée renfermant sels minéraux et glucose nécessaire à la croissance cellulaire.

SOLUTION A

NaCl	80	g
KCl	4	g
$CaCl_2$	1,4	g
$MgSO_4$, 7 H_2O	2	g
KPO_4H_2	0,6	g
Glucose pur	10	g
Eau bidistillée	1 000	ml

SOLUTION B

$NaHPO_4$, 12 H_2O	1,2	g
$NaCO_3H$	3,5	g
Rouge de phénol	0,2	g
Eau bidistillée	1 000	ml

MILIEU DEFINITIF

Solution A	50	ml
Solution B	10	ml
Eau bidistillée stérile	440	ml

pH = 7,2

Conservation indéfinie sans contaminations extérieures.

CHAPITRE II

CULTURE CELLULAIRE DES FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE POULET

1. CHOIX ET PREPARATION DES EMBRYONS
2. TRYPSINATION :
   - Préparation et concentration de la trypsine
   - Durée de la trypsination
   - Température
3. MISE EN CULTURE DES CELLULES

1. CHOIX ET PREPARATION DES EMBRYONS

Nous avons utilisé des embryons de Poulet de race Leghorn blanche, après incubation de 11 jours dans une couveuse artificielle MAMMOUTH (M T 800, la Nationale) réglée à une température de + 39° C avec un degré hygrométrique de 70 %. Dans cette couveuse, les oeufs sont placés sur la pointe, leur grand axe formant un angle de 45° avec l'horizontale. Le changement de sens de l'inclinaison par rapport à la verticale se fait périodiquement et automatiquement.

Les oeufs fécondés incubés 11 jours sont ensuite mirés dans une pièce noire (162) de façon à n'utiliser que les embryons présentant des mouvements nets. Chaque essai demande environ quarante à soixante oeufs pour obtenir une culture suffisante.

Dans une pièce stérilisée au préalable par des lampes à rayonnement ultra-violet nous procédons ensuite à la préparation de la culture cellulaire. Les

coquilles sont lavées à l'alcool, cassées au-dessus d'une boîte de PETRI stérile, l'embryon est dégagé de ses menbranes à l'aide de pinces stériles et dans une autre boîte stérile la tête, les pattes et les viscères sont écartés avec de petits ciseaux stériles. Les corps embryonnaires ainsi préparés sont placés dans une fiole de FOURNEAU stérile, où ils seront hachés en fins morceaux à l'aide de grands ciseaux stériles après avoir été lavés au liquide de HANKS additionné d'antibiotiques (Sulfate de Streptomycine 40 µg/ml, Benzyl-Pénicillinate de Sodium 200 U/ml). La pulpe embryonnaire est encore une fois lavée et décantée avec le même liquide de façon à éliminer le plus possible d'hématies de Poulet. Nous pouvons alors procéder à la trypsination.

2. TRYPSINATION

Le premier stade important de la culture cellulaire de fibroblastes d'embryons de Poulet, est la trypsination.

Il est en effet nécessaire de détruire la structure du tissu pour obtenir des cellules isolées les unes des autres. Il faudra donc utiliser un enzyme protéolytique suffisamment actif pour lyser la trame conjonctive, mais incapable de détruire les corps cellulaires. L'enzyme couramment employé en culture cellulaire est la trypsine.

Le procédé de préparation de la trypsine semble avoir peu d'influence sur l'obtention de la couche unicellulaire. Nous avons en effet pratiqué des essais avec de la trypsine amorphe dite au 1/250 (fournie par les laboratoires DIFCO*) et avec de la trypsine cristallisée DIFCO sans observer de différences sensibles quant aux résultats, bien que cette dernière soit plus active (154). Par contre la concentration de la trypsine et l'âge de la solution paraissent avoir une influence déterminante sur l'obtention à la fois d'une couche cellulaire convenable et des plages. Finalement nous avons adopté les conditions suivantes qui nous ont paru optimales : la solution de trypsine a été réalisée dans du liquide de HANKS à la concentration de 1 o/oo et conservée au frigidaire pendant une semaine.

*DIFCO Laboratories. DETROIT. MICHIGAN.

En effet, si l'utilisation est immédiate, la lyse cellulaire est beaucoup trop importante et l'on obtient une quantité appréciable de cellules mortes. Ces cellules mortes ne se différencient pas des cellules vivantes lors de la numération au microscope, on aura un inoculum trop faible pour obtenir une couche parfaitement homogène et les plages ne pourront pas se manifester. Cette solution fraîche de trypsine semble donc se comporter comme une solution de titre trop fort.

Pour vérifier expérimentalement cette hypothèse sur le vieillissement de la solution de trypsine, nous avons utilisé la méthode de SCHWACHMAN (204) modifiée comme suit, pour effectuer un titrage grossier de la trypsine.

PRINCIPE

L'activité trypsique est évaluée grâce à son pouvoir de digestion de la gélatine sur un film photographique. Nous avons utilisé ici les films dentaires KODAK (film Périapical I KODAK).

Sur une série de films on dispose une goutte de la dilution choisie de solution trypsique à côté d'une goutte du liquide de dilution qui servira de témoin. Les films sont placés dans des boîtes de PETRI et mis à la surface d'un bain-marie à + 37° C pendant une heure de façon à ce qu'ils soient maintenus dans une atmosphère humide. Après une heure à + 37° C, les films sont lavés sous le robinet. Trois cas peuvent se produire :

1) La gélatine a totalement disparu à l'emplacement de la goutte de solution trypsique mais persiste à l'endroit de la goutte témoin : le résultat est positif, c'est-à-dire que la solution est active à cette dilution.

2) La gélatine persiste à l'emplacement de la goutte de solution trypsique et à celui de la goutte témoin : l'essai est négatif, c'est-à-dire que la solution est inactive à cette dilution.

3) La gélatine persiste à l'emplacement de la goutte témoin et apparait plus ou moins ridée ou partiellement disparue dans la goutte de solution trypsique : l'essai est alors douteux et il est nécessaire de le recommencer en encadrant cette dilution de dilutions très proches.

Au cas où la gélatine aurait disparu à l'emplacement de la goutte témoin, l'essai est sans valeur.

En utilisant cette méthode à partir d'une solution de trypsine à 1 o/oo dans le liquide de HANKS, les dilutions successives étant réalisées dans le même

liquide, nous avons obtenu les résultats suivants :

Le jour de la préparation, et avant de filtrer la solution sur filtre stérilisant SEITZ EKS, la dilution active est $1/2 \times 10^{-4}$. La trypsine est alors plutôt en suspension qu'en solution, ce qui fait que son dosage n'a pas grande valeur. Après 24 heures de repos au frigidaire et après filtration, la dilution active est $1/4 \times 10^{-2}$.

Après 48 heures : $1/4 \times 10^{-2}$
Après 3 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
4 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
5 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
6 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
8 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
12 jours : $1/2 \times 10^{-2}$
21 jours : 10^{-2}

Ainsi la solution de trypsine dans le liquide de HANKS semble stable au moins pendant la période allant du 4ème au 12ème jour suivant sa préparation. Son activité protéolytique une semaine après sa filtration est approximativement la moitié de celle d'une solution fraîche. Bien qu'il semble à première vue que le titre de la trypsine ait baissé de la moitié de sa valeur primitive, les résultats obtenus ne sont pas les mêmes si l'on utilise une solution de trypsine fraîche à 0,5 o/oo et une solution préparée à 1 o/oo et conservée une semaine à + 4° C.

Dans le premier cas, la trypsination est très incomplète : les tissus sont insuffisamment attaqués, il reste beaucoup d'amas cellulaires même en prolongeant l'action de la trypsine et l'on obtient peu de cellules isolées. Cette concentration permet néanmoins l'obtention de plages, mais elle nécessite l'utilisation d'un nombre d'embryons de poulets bien supérieur, environ le double du nombre habituellement utilisé avec notre technique. En particulier, l'adhérence des cellules à la paroi de verre ou de matière plastique est aussi bonne.

Certains auteurs (171) ont conseillé l'utilisation d'une solution de trypsine à 0,5 ou même 2 %. Pour notre part, avec ces concentrations nous avons obtenu une culture cellulaire qui montrait très rapidement des lésions cellulaires importantes et une dégénérescence plus rapide (en 3 jours la culture était pratiquement morte). De toute façon, nous n'avons jamais pu obtenir de plages sur les cellules ainsi lésées. Il semble donc que par vieillissement, la trypsine ait perdu une partie de son activité protéolytique sur le cytoplasme cellulaire peut-être par action d'une protéolyse limitée sur elle-même, mais la vérification de cette hypo-

thèse dépasserait le cadre de notre travail.

Nous nous contenterons de conclure empiriquement que la méthode de préparation de la trypsine qui nous a paru optimale pour l'obtention de notre culture cellulaire en vue de la formation de plages est la suivante :

Poser 1 g de trypsine amorphe DIFCO 1/250 (conservée au frigidaire) et l'introduire dans une fiole jaugée de 1 litre. Agiter dans un peu d'eau distillée. Ajouter 900 ml de liquide de HANK'S. Neutraliser le milieu par addition de bicarbonate de sodium (solution à 14 o/oo utilisée couramment en perfusion) jusqu'à obtention de la nuance rouge-orangé correspondant à un pH - 7. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète. Laisser 24 heures la solution au frigidaire pour parfaire la dissolution. Filtrer ensuite sur filtre SEITZ EKS pour stériliser la solution. Conserver dans un récipient stérile hermétiquement fermé à + 4° C pendant une semaine.

De fait cette solution de trypsine est conservée dans les plus mauvaises conditions :

Le pH de la solution est compris entre 6, 8 et 7, 2 or dès que le pH est supérieur à 5 (20), il y a autolyse et il se produit de nombreux petits fragments sans activité. Le liquide de HANKS ne contient pas d'acide aminés, glycine ou lysine, qui pourraient protéger la trypsine de la dénaturation (52). Par contre, il contient 2, 5 m Mole de Ca++ réputé protecteur de la dénaturation protéique (31), mais il faudrait 0, 9 % au moins d'ions calcium pour protéger la trypsine à pH 5, 5 (52).

Par contre, la concentration en ions calcium et en ions magnésium du liquide de HANKS et du milieu à l'hydrolysat de caséine que nous utiliserons ensuite, suffit à éviter l'altération spontanée de la culture cellulaire soumise à l'action de la trypsine en solution aqueuse additionnée d'antibiotique (144).

Mais les cellules trypsinées perdent la propriété d'adhérer sur un support tel que le verre ou la matière plastique (253) il faudra donc rajouter une substance leur restituant cette propriété pour les mettre en culture (76 - 192).

TEMPS DE TRYPSINATION

Le but de la trypsination des embryons hachés est de libérer du tissu conjonctif les cellules fibroblastiques sans altérer ni le cytoplasme ni la membrane de façon à ce qu'elles puissent par la suite, d'une part adhérer à une paroi de

*Délivrés par COFRAM, 5, rue Abel PARIS XII

verre ou de matière plastique et d'autre part se multiplier suffisamment pour obtenir un film continu unicellulaire tout en restant saines pendant plusieurs jours (en pratique une semaine). Pour obtenir des cellules isolées et parfaitement saines, le temps de trypsination est une phase importante de la culture.

L'action de la trypsine ne dépassant pas une heure, quelquefois conseillée par certains auteurs, nous a paru insuffisante, tout au moins avec le mode de préparation que nous avons choisi pour cette solution de trypsine. De cette façon, nous n'avons jamais pu obtenir de plages ni avec le virus SINDBIS ni avec le virus de la maladie de NEWCASTLE.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec un temps de trypsination de 2 heures 30, mais ceci dans des conditions bien particulières.

En effet, si l'on se contente de faire agir la solution de trypsine pendant 2 heures 30 sur les embryons hachés, soit à 37° C soit à la température du laboratoire, la culture cellulaire obtenue par la suite meurt très rapidement (2 à 3 jours) sans avoir réalisé le film unicellulaire recherché et là encore, aucune plage ne se manifeste.

Nous avons ensuite essayé la technique utilisée par HANNOUN et PANTHIER (96, 97) qui consiste à décanter après une action d'une demi-heure la trypsine contenant les cellules isolées, puis à la remplacer par une solution fraîche dont on laisse poursuivre l'action à la température ordinaire pendant deux heures. De cette façon, nous avons obtenu de bons résultats mais trop irréguliers d'un essai à l'autre pour pouvoir établir des comparaisons.

TEMPERATURE DE TRYPSINATION

Les embryons hachés et lavés sont introduits dans une fiole de FOURNEAU et recouverts de solution trypsique de façon à avoir environ 5 ml de trypsine par embryon. Cette fiole est placée sur un agitateur magnétique dans une étuve à +37° C. On laisse la digestion se poursuivre trente minutes. Après cette première digestion, on laisse reposer quelques instants la fiole de façon à ce que les débris de tissus tombent au fond mais que le liquide surnageant contenant les cellules isolées soit encore trouble et homogène. A ce moment, ce liquide surnageant est décanté dans une autre fiole de FOURNEAU que l'on met immédiatement dans un bac à glace. Ceci a pour but d'arrêter instantanément l'action de de l'enzyme pour éviter que ces cellules isolées ne soient attaquées par la trypsine. On remplace le liquide décanté par une solution fraîche de trypsine et on laisse la digestion se poursuivre pendant encore deux heures sur agitateur magnétique à la

température du laboratoire. Au bout de ces deux heures, le liquide surnageant est décanté de la même façon que précédemment et ajouté au premier.

La plupart des auteurs qui n'arrêtent pas l'action de l'enzyme par la glace, conseillent généralement de jeter le résultat de la première demi-heure de trypsination. Il semble probable que la lyse cellulaire, immanquablement obtenue si on laisse les cellules isolées soumises à l'action de la trypsine, produit des substances toxiques pour la culture cellulaire ultérieure.

Il est donc extrêmement important de pratiquer une décantation soigneuse de cette première trypsination de façon à éliminer au maximum les cellules libérées.

De plus, après 30 minutes à + 37° C l'activité de la trypsine paraît insuffisante pour attaquer les amas cellulaires importants comme nous avons pu le voir en poursuivant l'action d'une même solution pendant une heure trente. En effet, au bout de ce temps il reste une forte proportion de débris embryonnaires non attaqués alors qu'il y a déjà une lyse cellulaire importante, ce dont il est facile de se rendre compte lors de la numération des cellules au microscope. L'addition de trypsine frafche est donc nécessaire pour libérer totalement les cellules fibroblastiques du réseau conjonctif.

Pour résumer cette méthode de trypsination, nous avons donc adopté une première digestion de 30 minutes à + 37° C sur un agitateur magnétique suivie d'une décantation, le liquide décanté étant aussitôt mis dans la glace. Puis une deuxième digestion se poursuit à la température ordinaire pendant deux heures avec une nouvelle solution de trypsine, toujours sur agitateur magnétique.

Nous avons obtenu un plus grand nombre de cellules en réchauffant au préalable à + 37° C la solution de trypsine utilisée.

Avant de compter les cellules pour la mise en culture, il est nécessaire de filtrer le liquide des deux décantations. En effet, si les gros débris embryonnaires ont été éliminés par la décantation, il peut rester de petits amas cellulaires susceptibles de fausser la numération car ils ne se comporteraient pas en culture comme une cellule libre et formeraient de plus une surépaisseur sur le tapis uniforme que l'on cherche à obtenir pour mettre en évidence les plages.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une double filtration sur douze épaisseurs de gaze stérile. Pour réaliser cette filtration, nous avons disposé douze épaisseurs de gaze sur un entonnoir de 150 mm de diamètre, fixées par un élastique après les avoir bien tendues. L'extrémité de l'entonnoir est bouchée

au coton cardé puis l'ensemble est enveloppé dans une feuille de papier d'aluminium et ensuite stérilisé 20 minutes à + 120° C. Au moment de la filtration, le filtre de gaze est protégé par le couvercle d'une boîte de PETRI de 150 mm, stérile, de façon à opérer aseptiquement. Pour cela l'extrémité de l'entonnoir, débarassée de son filtre de coton cardé, est flambée et introduite dans le goulot d'une fiole de FOURNEAU. Cette opération est renouvelée sur un autre entonnoir garni lui aussi de douze épaisseurs de gaze hydrophile.

Après ces deux filtrations, on a obtenu un liquide trouble parfaitement homogène. On en sépare les cellules par centrifugation.

Pour opérer cette centrifugation, nous avons réparti ce liquide dans des pots à centrifuger à bouchon à vis de 45 ml, stériles. La centrifugation se fait à 1 000 tours/minute pendant cinq minutes.

Pour éliminer totalement la trypsine il est nécessaire non seulement de rejeter le liquide surnageant mais de laver au moins deux fois les cellules avec un liquide isotonique convenable, par exemple avec du liquide de HANKS ou du milieu utilisé ultérieurement pour la culture. Nous avons utilisé comme liquide de lavage le liquide de HANKS de façon à faire plus facilement des comparaisons entre les divers milieux de culture par la suite. Ce lavage se fait en remettant en suspension les cellules dans du liquide neuf puis en centrifugeant à nouveau cinq minutes à 1 000 tours/minute, en décantant et renouvellant ce lavage. On obtient ainsi un culot de cellules que l'on mettra en suspension dans le milieu de culture choisi, à raison de 1ml de milieu pour un embryon, de façon à avoir une suspension concentrée que l'on diluera convenablement après le dénombrement des cellules.

3. MISE EN CULTURE DES CELLULES

La concentration de la suspension cellulaire est d'une importance capitale d'abord pour l'obtention d'une couche cellulaire parfaitement homogène et adhérente, mais surtout pour l'obtention des plages.

En effet, il faut que le virus se multiplie dans des cellules jeunes en période d'activité maximale, c'est-à-dire en voie de développement : elles doivent donc être parfaitement saines et résistantes. D'autre part, pour que l'on puisse distinguer l'effet cytopathogène, il faut que le tapis cellulaire soit parfaitement continu, lisse et homogène de façon à ce que l'on ne prenne pas pour des plages un "accident" de la préparation, dû soit à une surépaisseur de la couche de cellules, soit à un trou provoqué par un décollement partiel de cette couche cellulaire.

Ainsi nous avons pu voir que si la concentration est trop importante les cellules n'ont pas suffisamment d'espace pour se développer et se reproduire normalement ; elles s'empilent alors les unes sur les autres. De cette façon, seules les cellules en contact avec la paroi de verre adhérent à celle-ci, mais mais l'épais amas formé au dessus les entraîne et la couche cellulaire toute entière a tendance à se décoller comme une crêpe par suite de la mauvaise adhérence au support. On observe d'ailleurs à l'aide du Rouge neutre une dégénérescence rapide de toute la culture, dégénérescence qui se produit en moins de 48 heures.

Si la concentration en cellules est insuffisante, on ne pourra pas d'avantage observer de plages. En effet, la culture peut être insuffisante pour obtenir un tapis continu et il est alors impossible de distinguer macroscopiquement un effet cytopathogène quelconque ; ou bien la culture peut paraître suffisante pour obtenir un film unicellulaire sans qu'elle soit apte à faire multiplier convenablement le virus ou à lui faire produire des plages. Ce film apparemment parfait mais toutefois insuffisant, a quelque temps retardé nos recherches.

On voit donc que la numération des cellules est une opération importante et même tout à fait indispensable si l'on veut obtenir des résultats reproductibles.

Pour pratiquer cette numération, on peut utiliser un mélangeur de POTAIN pour leucocytes et une cellule de MALASSEZ ou bien compteur de particules.

NUMERATION A L'AIDE DE LA CELLULE DE MALASSEZ

On pratiquera à partir de la suspension cellulaire contenant un embryon par ml une dilution au 1/20 avec un mélangeur de POTAIN pour leucocytes.

La dilution peut se faire soit avec le milieu de culture choisi, soit avec du liquide de HANKS ou même du tampon couramment utilisé*. Une goutte de cette dilution homogène est placée dans une cellule de MALASSEZ et l'on compte les fibroblastes présents, par exemple dans une rangée de quatre lignes de la cellule de MALASSEZ, ce qui équivaut à un volume de 1/10 mm3.

Si l'on a compté n cellules dans une rangée, on a : n x 10 cellules dans 1 mm3 ou n x 10 x 1 000 cellules dans 1 ml de la dilution au 1/20, ce qui revient à :

n x 20 x 10 x 1 000 cellules dans la suspension initiale. Pour obtenir une suspension à 2 millions/ml, il faudra donc diluer cette suspension à :

$$\frac{n \times 20 \times 10 \times 1\,000}{2.000.000} = \frac{n}{10}$$

Exemple numérique :

La trypsination effectuée sur 40 embryons permet d'obtenir finalement 40 ml de suspension de fibroblastes. Après dilution au 1/20 dans un mélangeur de POTAIN, on trouve 30 cellules sur une ligne de la cellule de MALASSEZ. Le volume final du milieu sera donc :

$40 \times \frac{30}{10}$ soit 120 ml, ce qui revient à rajouter 80 ml de milieu de culture à 10 % de sérum de veau, soit 72 ml de milieu et 8 ml de sérum de veau.

Bien entendu, ce calcul n'est valable que si toutes les cellules comptées sont vivantes. On pourrait ajouter un colorant vital au milieu de dilution pour s'en assurer. Pratiquement, avec la technique de trypsination que nous avons finalement adoptée, les cellules présentes sont vivantes.

Il y a cependant quelques écueils à éviter pour pratiquer cette numération. Tout d'abord, l'homogénéité de la suspension doit être parfaite : nous avons déjà insisté plus haut sur la différence de comportement entre une cellule et un amas de cellules lorsqu'il s'agit de se fixer sur une paroi avant de se mul-

*Formule donnée avec la méthode de dilution de la suspension virale.

tiplier. Il faut donc se mettre à l'abri de cette éventualité en observant toute la surface de la cellule de MALASSEZ pour vérifier l'homogénéité de la suspension. Si celle-ci n'est pas parfaite, il vaut mieux réhomogénéiser la suspension initiale et refaire une dilution au 1/20. Il convient d'ailleurs de travailler rapidement car les fibroblastes étant relativement denses, se déposent très rapidement au fond du récipient.

La deuxième cause d'erreur possible et même fréquente, est dûe à la présence d'hématies de Poulet qui n'ont pu être totalement éliminées malgré les lavages des corps embryonnaires d'abord, puis des culots cellulaires au liquide de HANKS. On reconnaît assez facilement ces hématies au microscope : elles sont nucléées de forme régulière, ovales ou arrondies alors que les cellules qui nous intéressent sont beaucoup moins régulières, soit plus grandes, soit plus petites. Il est important de faire cette différence à chaque numération car la proportion des hématies par rapport aux fibroblastes varie dans de très larges limites d'une culture à l'autre.

NUMERATION A L'AIDE DU COMPTEUR DE PARTICULES

Cette numération des fibroblastes à l'aide de la cellule de MALASSEZ est assez longue et fastidieuse, d'autant plus qu'il est nécessaire de faire une moyenne sur plusieurs lignes pour éviter au maximum les erreurs. La numération est largement facilitée par l'emploi d'un compteur de particules type "COULTER". Grâce à cet appareil on peut en effet compter dans une population cellulaire variée uniquement les cellules de taille et volume choisis.

Il reste encore à répartir convenablement la suspension définitive contenant 2.000.000 de cellules par ml. On ne peut choisir d'emblée le volume de suspension à répartir dans différents récipients, la forme du récipient ayant autant d'importance que son volume.

Après plusieurs essais, nous avons finalement adopté comme volumes les plus aptes à fournir une bonne couche cellulaire et de belles plages, les quantités suivantes :

Pour les flacons standard de :

200 ml _____ 25 ml de suspension

125 ml _____ 12,5 ml de suspension

90 ml _____ 10 ml de suspension.

Pour les flacons-lamelles de :

5 ml _____ 1,8 ml de suspension.

Pour les boîtes de PETRI de 5 cm de diamètre :

5 ml de suspension.

En effet, dans les flacons fermés par un bouchon de caoutchouc, il ne faut pas que le liquide soit en contact avec le caoutchouc, celui-ci semblant céder des produits toxiques pour les cellules. Si les flacons sont bouchés au coton cardé, on risque une fuite et,partant,un milieu septique.

De plus, nous avons remarqué dans les cultures en boîtes de PETRI qu'un volume trop fort avait les mêmes inconvénients qu'une concentration trop importante comme on pouvait s'y attendre. Dans les deux cas l'abondance et le poids des cellules ont tendance à amener le décollement de la couche cellulaire qui devient de plus, extrêmement fragile.

Les boîtes de PETRI que nous avons utilisées sont distribuées par la maison JOUAN*, spécialement conçues pour la Virologie et livrées stériles par 10, sous emballage plastique (Nunclon).

* JOUAN : 113, Boulevard Saint-Germain - PARIS VI.

CHAPITRE III

MILIEUX DE CULTURE DE LA COUCHE CELLULAIRE

ADDITION DE :

- BICARBONATE DE SODIUM
- ACIDE OXALACETIQUE
- TRIS
- GAZ CARBONIQUE
- SERUM DE VEAU

MILIEUX DE CULTURE DE LA COUCHE CELLULAIRE

Tout en gardant comme milieu de base le milieu à l'hydrolysat de caséine fourni par l'Institut Pasteur, nous avons essayé d'étudier les avantages et les inconvénients présentés par quelques produits susceptibles de compenser l'acidité produite par le métabolisme important des cellules en division.

Ces produits ont été utilisés par différents auteurs, soit pour la culture cellulaire, soit pour l'obtention de plages. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec :

- le bicarbonate de sodium (131),
- l'acide oxalacétique (89),
- le Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (215).

L'utilisation du bicarbonate de sodium comme produit alcalinisant exige l'emploi de flacons hermétiquement bouchés au caoutchouc ; si l'on désire travailler avec des flacons ouverts ou des boîtes de PETRI, il est nécessaire de les placer dans une atmosphère enrichie en gaz carbonique.

L'utilisation de milieu au Tris exige aussi une atmosphère enrichie en gaz carbonique (174).

Par contre, l'acide oxalacétique offre l'avantage de pouvoir travailler en boîtes de PETRI, sans atmosphère enrichie en gaz carbonique, en simple équilibre avec l'air (89).

Nous avons également essayé d'observer le comportement des cellules en utilisant les milieux suivants :

- Tris en flacon bouché,
- Tris en équilibre avec l'air,
- Acide oxalacétique en équilibre avec le gaz carbonique,
- Bicarbonate en équilibre avec l'air.

Après avoir décrit la composition de ces milieux liquides, nous étudierons successivement l'influence de ces différents milieux sur :

- l'aspect macroscopique de la culture cellulaire,
- l'aspect microscopique des cellules obtenues,
- la formation de plages,
- la conservation de celles-ci.

PREPARATION DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE

Nous avons déjà dit que le milieu de base utilisé restait dans tous les cas de notre étude le milieu à l'hydrolysat de caséine fourni par l'Institut Pasteur.

Il a été décrit par LEPINE et Coll. (131). Il s'agit d'un milieu semi-synthétique complet de la composition suivante :

1) Solution de base :

a) Solution saline de EARLE

Solution A :	NaCl	68	g
	KCl	4	g
	CaCl2	2	g
	$MgSO_4$, 7 H_2O	2	g
	$NaPO_4H_2$, 2 H_2O	1,56	g
	Glucose pur	10	g
	H_2O bidistillée	1 000	ml

b) Solution 1 = complexe de vitamines B

Nicotinamide	0.10	g
Chlorhydrate de Pyridoxal	0,10	g
Thiamine	0,10	g
Acide para-aminobenzoïque	0,10	g
Pantothénate de Calcium	0,10	g
Choline	0,10	g
Riboflavine	0,01	g
Eau bidistillée q. s. p.	100	ml

c) Solution 2

Biotine	0,10	g
Eau bidistillée	100	ml

d) Solution 3

Acide folique	0,10	g
Solution de bicarbonate de sodium à 2,8 %	100	ml

e) Solution B de EARLE

$NaCO_3H$	55	g
Rouge de phénol	0,5	g
Eau bidistillée	1 000	ml

2) Milieu définitif :

Hydrolysat de caséine	0,500	g
Glutamine	0,150	g
Chlorhydrate de cystéine	0,010	g
Acide ascorbique	0,050	g
Solution A de EARLE	100	ml
Eau bidistillée	860	ml

Après dissolution, ajouter :

Solution 1.....	1	ml
Solution 2.....	1	ml
Solution 3.....	1	ml
Solution B de EARLE	40	ml

Stériliser par filtration sur bougie L_3 et conserver en flacons hermétiquement bouchés.

L'Institut Pasteur a commercialisé ce milieu sous forme concentrée, présentée en coffret de 2 ampoules, l'une de 50 ml contenant le milieu complexe et l'autre de 20 ml contenant le bicarbonate de sodium coloré par le Rouge de phénol. Il suffit d'ajouter 430 ml d'eau bidistillée stérile pour obtenir 500 ml de milieu à l'hydrolysat de caséine.

A tous les milieux utilisés, milieu à l'hydrolysant de caséine, milieu de PARKER, milieu de HANKS , solution tampon, etc..., nous avons toujours ajouté les antibiotiques usuels, à savoir Benzyl-Penicillinate de Sodium 200 U/ml, Sulfate de Streptomycine 40µg/ml.

Il ne nous a pas paru nécessaire d'ajouter un produit antifongique, mycostatine ou autre, car nous n'avons observé aucune contamination par les moisissures à partir du moment où nous avons traité les bouchons de caoutchouc de la manière suivante :

Bouchons neufs :

Ils sont lavés à l'eau courante, puis plongés dans l'eau bouillante quinze minutes dans une solution de carbonate de sodium à 5 g/litre, puis maintenus vingt

minutes dans de l'eau distillée bouillante. Enfin, ils sonr rincés trois fois dans de l'eau distillée.

Bouchons déjà utilisés :

Ils sont lavés à l'eau courante avec une brosse dure, puis à nouveau lavés à l'eau chaude avec le détersif utilisé pour la verrerie et rincés longuement dans l'eau courante. Enfin, comme les bouchons neufs, ils sont portés vingt minutes dans l'eau distillée bouillante et rincés.

Une fois prêts à être mis en service de cette façon, les bouchons de caoutchouc sont enveloppés dans du papier filtre individuellement et stérilisés à l'autoclave 20 minutes à + 120° C comme toute la verrerie que nous utilisons.

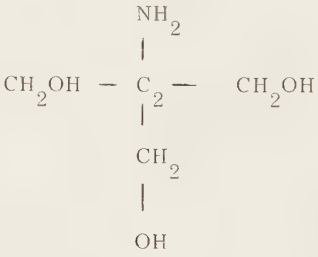
BICARBONATE DE SODIUM

CO_3HNa

Le milieu à l'hydrolysat de caséine et bicarbonate que nous avons utilisé est celui qui vient d'être décrit sans aucune modification.

TRIS

Le produit appelé communément Tris, abréviation de tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane est, suivant la nomenclature internationale, l'amino-2-(hydroxyméthyl) 2-propane-diol 1-3



Le milieu au Tris a été réalisé de la façon suivante, une solution concentrée a été préparée avec :

Tris	15	g
Rouge de Phénol à 0,1 %	1,5	ml
Acide chlorhydrique conc.	5,8	ml
Eau bidistillée q. s. p.	100	ml

Cette solution concentrée est filtrée sur filtre SEITZ EKS puis conservée au frigidaire.

Au moment de l'emploi, on prépare le milieu avec hydrolysat de ca-caséine de l'Institut Pasteur concentré, 1 ampoule

Rouge de Phénol à 0,1 % 1,5 ml

Eau bidistillée stérile 450 ml

Tris en solution concentrée 1 % soit 5 ml

HCl $\frac{N}{4}$ q. s. p. neutralité au rouge de Phénol.

ACIDE OXALACETIQUE

$COOH-CO-CH_2-COOH$

L'acide oxalacétique, intermédiaire du cycle de KREBS paraît une source de gaz carbonique naturelle et d'autre part il supplée à l'impossibilité que présentent les cellules de fabriquer elles-mêmes leur acide oxalacétique à partir du gaz carbonique lorsqu'il n'y en a ni dans le milieu ni dans l'atmosphère.

Le milieu à l'acide oxalacétique utilisé a été préparé comme suit, suivant la technique proposée par SIMINOVITCH et Coll. (89).

Solution concentrée d'acide oxalacétique à 200 mM o/oo soit 13,2 g/500ml ou 0,66 g/25 ml.

Au moment de l'emploi, on prépare de milieu à l'hydrolysat de caséine comme il a été dit plus haut pour le milieu au Tris, c'est-à-dire sans ajouter le contenu de l'ampoule de bicarbonate de sodium qui est remplacé ici par :

Solution d'acide oxalacétique concentrée 5 ml

Solution de Rouge de Phénol à 0,1 % 1,5 ml

Soude $\frac{N}{4}$ q. s. p. neutralité au Rouge de Phénol.

Ceci pour 500 ml de milieu final.

SERUM DE VEAU

Le sérum de veau a souvent été incriminé en Virologie. PORTERFIELD (169) rapporte avoir obtenu dans ses essais des résultats variant de 1 à 100 avec différentes sources de sérum de veau. Il compare l'inhibiteur probablement présent dans le sérum de veau à l'inhibiteur d'hémagglutination présent dans la fraction lipidique et pense qu'il agirait en réduisant la capacité des cellules, soit à adsorber soit à produire les virus et non directement sur les virus.

De même CASALS et OLITSKY (39) ont noté une action virulicide importante du sérum de cheval sur un certain nombre de virus neurotropes. HANA, LIBIKOVÁ et VILČEK (92, 136) ont montré que de fortes concentrations de sérum de cheval empêchaient la production d'effet cytopathogène de virus encephalitiques sur des cellules HELA.

PORTERFIELD (171) pour éviter ces inconvénients, utilise la peptone

(BACTO-DIFCO) à 0,1 % au lieu de sérum qui ne semble pas convenir pour tous les systèmes cellules-virus.

Pour notre part, nous avons utilisé le sérum de veau qui aiderait les cellules trypsinées à adhérer au verre (76, 193) grâce à sa fétuine, une αglycoprotéine. Pour obtenir un sérum de veau de qualité constante, nous avons toujours centrifugé à grande vitesse (6.000 tours/mn) pendant 10 minutes le sérum de veau filtré livré par l'Institut Pasteur avant de l'utiliser (162). Peut-être cette centrifugation élimine-t-elle la fraction lipidique incriminée par PORTERFIELD.

Nous avons ajouté 10 % de sérum de veau ainsi préparé au milieu de culture choisi.

CHAPITRE IV

RESULTATS COMPARES

DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Nous avons réalisé des essais de culture comparée avec les différents milieux décrits précédemment :

Hydrolysat de caséine additionné soit de bicarbonate,

soit de Tris,

soit d'acide oxalacétique.

Chaque suspension cellulaire a été répartie de la façon suivante :

- En flacon bouchés au caoutchouc gris, mis à l'étuve à + 37° C ordinaire,

- En flacons bouchés au coton cardé ou en boîte de PETRI mis à l'étuve à 37° C ordinaire,

- En flacons bouchés au coton cardé ou en boîte de PETRI mis à l'étuve à + 37° C avec atmosphère enrichie en gaz carbonique.

DESCRIPTION DE L'ETUVE
A ATMOSPHERE ENRICHIE EN GAZ CARBONIQUE

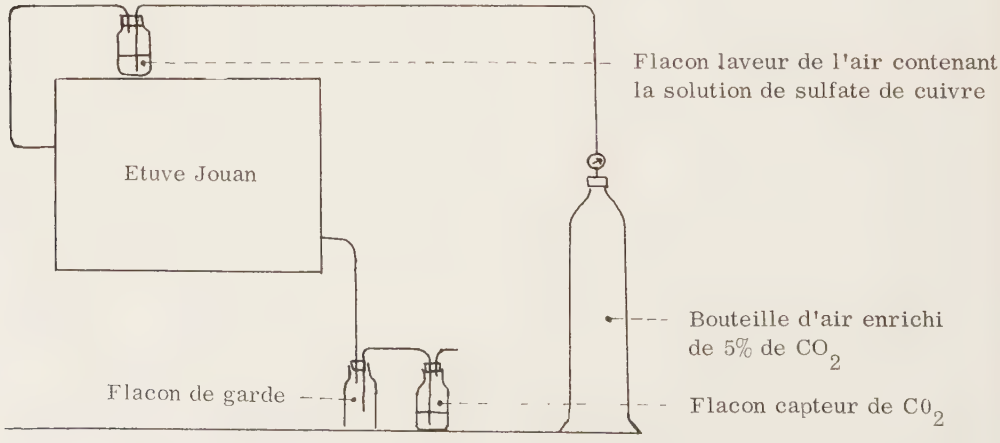
Nous avons utilisé les petites étuves JOUAN* réglables au demi-degré près.

Ces étuves, approximativement étanches grâce à la double porte vitrée et métallique, comportent deux possibilités de branchement, l'une située au sommet d'un petit côté de l'étuve, l'autre à la base du petit côté opposé.

Le mélange air et gaz carbonique étant plus lourd que l'air seul, le mélange a été branché sur le conduit supérieur, le conduit inférieur servant à l'évacuation des gaz. Le mélange d'air enrichi à 5 % de gaz carbonique a été fourni sur demande par la Société l'Air Liquide qui l'a livré sous forme de bouteilles métalliques munies d'un robinet à pointeau.

Le débit est réglé par un détendeur double relié à l'étuve par un tuyau de caoutchouc. Pour éviter la dissémination de champignons dans l'étuve, nous avons intercalé entre la bouteille métallique et l'étuve un flacon laveur rempli d'une solution à 1 % de sulfate de cuivre selon les recommandations de PAUL (161). Un tampon de coton cardé filtre l'air à la sortie du flacon laveur. Un tuyau branché à la partie inférieure de l'étuve aboutit dans un flacon contenant une solution de potasse qui absorbe le gaz carbonique. Le débit utile mesuré au débitmètre est de 250 ml/minute.

Le schéma de l'étuve à gaz carbonique utilisée est donc le suivant :



*JOUAN, 113, Boulevard St Germain, PARIS VIe

Les cultures sont abandonnées 18 heures à l'étuve. Pratiquement après 15 minutes d'étuve, les cellules adhérent déjà au support de verre ou de matière plastique. Après 18 heures de culture, les cellules vivantes et saines adhérent vigoureusement au support et le liquide nutritif ne contient plus en suspension que des cellules mortes ou dégénérées.

Avant de répartir l'inoculum du virus sur les différentes cultures d'embryons de Poulet, il est nécessaire de vérifier l'état de la culture. Les virus, pour se développer normalement ont besoin en effet de cellules parfaitement saines en voie de multiplication. Un essai comparé sur des cellules saines et des cellules en voie de dégénérescence n'aurait aucune valeur.

Il faut donc tout d'abord vérifier si les cellules sont mortes ou vivantes. réponse fournie par la couleur de l'indicateur de pH du milieu nutritif. Le métabolisme cellulaire donnant des produits acides, le milieu doit virer à l'orangé dans les cultures bien vivantes. Un excès d'acidité indiqué par une couleur orangée risque d'altérer, sinon de tuer, les cellules. Un excès d'alcalinité indiqué par une couleur rouge violacé signe la mort certaine des cellules. L'examen macroscopique est complété par l'appréciation de la couche cellulaire dont la qualité est un facteur essentiel dans l'obtention ultérieure des plages. Pour que la couche cellulaire soit utilisable pour la culture de virus, elle doit être parfaitement homogène, formant un tapis continu. On doit éliminer flacons et boîtes qui comporteraient des trous même dûs à un phénomène mécanique (secousse trop violente, jet de pipette mal dirigé) ou des manques, dûs à une insuffisance de multiplication ou des surépaisseurs ou toute autre altération visible à l'oeil nu.

Un tapis discontinu, comportant seulement des clones mal reliés, est généralement dû à un inoculum de cellules trop faible tandis que les surépaisseurs sont dûes à un inoculum de cellules trop important. Lorsque le liquide de culture est éliminé (en renversant le flacon à proximité d'une flamme) la couche cellulaire doit apparaître gris-bleuté et homogène sans aucune tendance au décollement des bords (ce qui serait dû encore une fois à un inoculum trop fort).

Une fois le liquide de culture éliminé, on peut procéder à l'examen microscopique grossier de la couche cellulaire. Pour cela, on dispose boîte ou flacon sur la platine du microscope de façon à ce que la paroi sur laquelle adhère la couche cellulaire soit le plus près de l'objectif, et on observe au faible grossissement. Les fibroblastes sont serrés les uns contre les autres, allongés et orientés dans le même sens. Les cellules mortes apparaissent arrondies et plus

pigmentées.

Pour réaliser un examen microscopique fin, il est nécessaire de procéder à une coloration et un montage sur lame de la culture cellulaire. La culture est alors conduite en petits flacons-lamelles sous un volume de 1,8 ml. Le liquide est éliminé après 18 heures de culture et remplacé par de l'alcool méthylique qui fixe les cellules.

On peut procéder de la même façon en boîte de PETRI, en matière plastique ce qui permet de découper la boîte sans matériel ni montage spécial.

Puis on procède à la coloration des cellules par les colorants de MAY-GRUNWALD-GIEMSA selon latechniquesuivante :

Après 5 minutes de contact avec l'alcool méthylique, les flacons sont vidés et on les laisse sécher l'ouverture en bas, en prenant soin de na pas éliminer la lamelle. Puis on remplit les flacons de MAY-GRUNWALD pur que l'on laisse agir 10 minutes.

On lave ensuite à l'eau distillée neutre.

On prépare extemporanément la solution de GIEMSA avec 1 ml de colorant pour 14 ml d'eau.

On remplit les flacons et laisse agir 20 minutes.

Puis on lave à l'eau neutre.

On déshydrate ensuite la préparation en la plongeant rapidement dans l'acétone (2 fois) puis le toluène (2 fois).

La lamelle est ensuite montée avec très peu de Baume de Canada sur une lame de verre dégraissée.

Ces différentes techniques nous ont permis d'observer les résultats suivants :

Macroscopiquement :

L'aspect des cultures obtenues avec le milieu à hydrolysat de caséine additionné de bicarbonate de sodium en flacons bouchés a été pris comme référence car c'est la méthode la plus couramment utilisée.

Le bicarbonate de sodium en boîtes de PETRI dans l'étuve à gaz carbonique nous a donné des résultats assez inconstants avec de toutes façons un fort pourcentage de milieux alcalinisées.

Le bicarbonate en boîte de PETRI sans atmosphère enrichie en gaz carbonique conduit immanquablement à la mort des cellules.

Le Tris en boîtes de PETRI mises à l'étuve à CO_2 donne de belles

cultures capables de vivre longtemps, pratiquement une semaine.

Le Tris en flacons fermés ou en boîte de PETRI à l'étuve ordinaire provoque une dégénérescence rapide des cellules avec alcalinisation du milieu.

L'acide oxalacétique fournit de belles cultures en boîtes de PETRI mises à l'étuve ordinaire. Mais ces cellules vivent moins longtemps que les autres : elles s'agglomèrent en petits îlots en 4 ou 5 jours. Le milieu devient acide.

L'acide oxalacétique en atmosphère de gaz carbonique fait rapidement mourir les cellules, mais cette fois par acidification trop importante du milieu.

Aspect microscopique de ces cultures :

A l'état frais, sans coloration :

Après 18 heures de culture, les cellules sont toutes allongées et semblables entre elles.

Après 48 heures de fortes différences s'accusent. Le Tris semble raccourcir les cellules tandis que l'acide oxalacétique les arrondit et les rétracte.

Après coloration (MAY-GRUNWALD-GIEMSA) :

En milieu bicarbonaté sodique sous courant de gaz carbonique, les cellules croissent rapidement. Après 48 heures de culture, elles apparaissent serrées les unes contre les autres, présentant l'aspect classique des fibroblastes :

- cellules très allongées,
- noyau central oblong coloré en rose violacé,
- deux nucléoles apicaux,
- le cytoplasme est bleu pâle,
- il y a peu ou pas de vacuoles, on observe de nombreuses mitoses.

C'est à ce type de cellules que nous allons comparer tous les essais réalisés.

En milieu bicarbonaté sodique sans anhydride carbonique, on observe des clones de quelques cellules. Il ne se forme pas de tapis continu. On voit beaucoup de cellules mortes (noyau très sombre et arrondi, cytoplasme arrondi), pratiquement pas de mitoses.

En milieu au Tris sans gaz carbonique, les fibroblastes sont moins allongés, le noyau est plus coloré. Les nucléoles sont plus nombreux (toujours plus de deux). Certains ont un aspect festonné. Mais la modification la plus frappante est la vacuolisation du cytoplasme.

En présence de gaz carbonique, ces phénomènes sont légérement corrigés, mais la vacuolisation du cytoplasme reste sensible.

De plus, le cytoplasme apparaît plus rosé que chez les fibroblastes normaux. La culture est cependant rapide et on observe de nombreuses mitoses.

Avec l'acide oxalacétique en présence de gaz carbonique, les cellules ne se développent pas : elles se contractent et les quelques clones obtenus meurent très vite. Les cellules moribondes prennent très fortement le colorant.

En milieu additionné d'acide oxalacétique sans gaz carbonique, les fibroblastes ont bel aspect : cellules allongées, cytoplasme bleu pâle ; le noyau montre souvent plus de deux nucléoles mais ils ont une apparence normale. On voit de nombreuses mitoses.

En définitive, les fibroblastes sont méconnaissables dans les milieux au bicarbonate sans gaz carbonique et à l'acide oxalacétique sous gaz carbonique.

La cytologie des fibroblastes paraît par contre excellente dans les cultures additionnées de bicarbonate de sodium sous courant de gaz carbonique ou d'oxalacétate de sodium sans gaz carbonique, moins bonne dans les cultures additionnées de Tris. Nous verrons plus loin cependant que ce dernier milieu donne de meilleurs résultats dans la formation des plages.

Il n'est pas facile de fournir une explication à ce fait, tout au plus nous permettrons-nous d'émettre une hypothèse en nous appuyant sur une autre expérience.

En inoculant à une culture cellulaire un virus cytopathogène 48 heures après la mise en culture, nous n'avons jamais pu obtenir de plages, pourtant les cellules paraissaient en nombre suffisant puisqu'elles formaient un tapis continu sans aucune surépaisseur. Il est probable que ces cellules âgées de 48 heures ne se divisent plus assez vite pour permettre une bonne multiplication du virus.

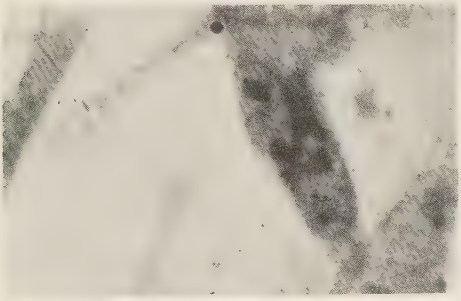
Les différents milieux étudiés ici se comportent peut-être comme accélérateurs ou inhibiteurs de vieillissement.

En effet, si le milieu convient bien au développement cellulaire, les fibroblastes vont se multiplier très vite, donc vieillir très vite et d'autre part appauvrir le milieu en substances assimilables et l'enrichir en produits de déchets.

Au contraire, si le milieu retarde le développement cellulaire, les fibroblastes moins nombreux, élimineront moins de produits de déchet et vieilliront moins vite, même si certains signes de souffrance se manifestent (mais que

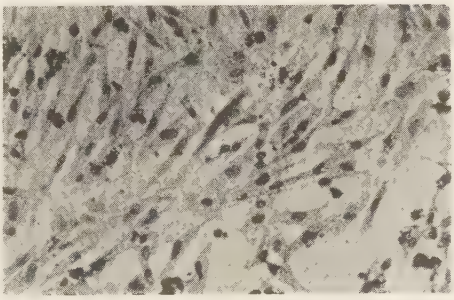
signifient les nombreuses vacuoles observées dans le cytoplasme des cellules cultivées en présence de Tris ?).

Cette théorie expliquerait la protection que manifeste le Tris envers les cultures cellulaires. Si ces fibroblastes dégénérent moins vite que les autres, c'est qu'ils vieillissent moins vite. Ils sont plus aptes que les autres à favoriser la multiplication virale.

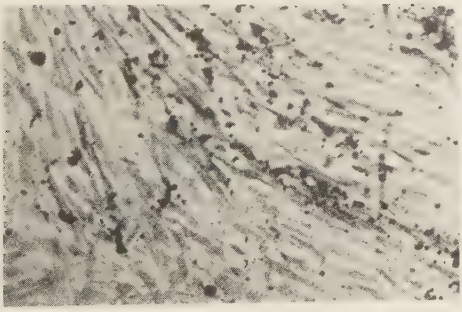


BICARBONATE DE SODIUM

G x 3750

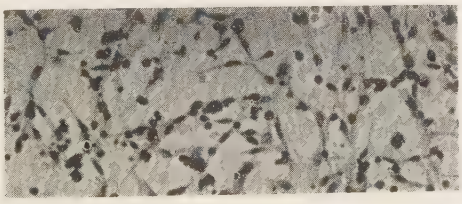


TRIS x 375



OXALACETATE DE SODIUM

OXALACETATE DE SODIUM + CO^2



T. E. S.

CHAPITRE V

INOCULATION DU VIRUS

1. ENTRETIEN DE LA SOUCHE DE VIRUS SINDBIS
2. VOLUME DE L'INOCULUM ET INOCULATION
3. TEMPS D'INCUBATION

1. ENTRETIEN DE LA SOUCHE DE VIRUS SINDBIS

Les essais ont été menés avec le virus SINDBIS, virus cytopathogène capable de cultiver sur embryon de Poulet.

Le virus, obligeamment fourni par Mr Cl. HANNOUN est le virus SINDBIS Eg Ar 339 provenant du laboratoire des Virus de la Fondation ROCKFELLER (97), a été entretenu par inoculation intra-crânienne au souriceau. En effet, la souris adulte semble insensible au virus SINDBIS (241).

Nous avons utilisé des souris suisses de race pure, mais non de lignée pure, fournies par Pharmasynthèse*. Les inoculations ont été faites au souriceau de 3 jours à l'aide d'une seringue à insuline montée avec une aiguille intra-dermique de 4/10. Autour de cette aiguille, nous avons enroulé du fil de cuivre de façon à laisser seulement 2 millimètres d'aiguille libre. Seringue et aiguille avec mandrin sont stérilisées et montées.

Nous avons appelé la suspension de deux cerveaux de souriceaux dans 1 ml de liquide de HANK'S, la dilution 10^{-1}, car un cerveau de souriceau pèse environ 50 mg.

On injecte à chaque souriceau 0,02 ml de la dilution 10^{-2} dans le liquide de HANKS en piquant verticalement le crâne. Le fil de cuivre enroulé autour de l'aiguille sert de garde.

Les souriceaux meurent au bout de quarante huit heures seulement. Il sera donc nécessaire de laisser la mère dans la cage pour qu'elle les nourrisse. Cette souris devra être sacrifiée car si elle ne meurt pas d'affection dûe au virus SINDBIS, on peut craindre qu'elle soit immunisée et transmette ses anticorps à une future portée de souriceaux.

Vingt quatre heures après l'inoculation intra-cranienne, les souriceaux semblent à demi-paralysés. Après quarante huit heures, les souriceaux sont mourants. Il vaut mieux ne pas attendre la mort (172) mais les sacrifier, sinon la mère risque de les dévorer avant que l'on ait pu prélever le cerveau.

Nous avons tué les souriceaux par immersion de la tête dans l'alcool qui provoque une axphyxie immédiate et de plus stérilise la peau du crâne. La boîte crânienne est immédiatement ouverte avec de petits ciseaux stériles et le cerveau est prélevé stérilement et placé dans la cuve stérile de l'homogénéiseur VERTEX . La récolte des cerveaux finie, on ajoute la quantité de liquide de HANKS additionné d'antibiotiques (Pénicilline 200 U/ml - Streptomycine 40µg/ml)

*Pharmasynthèse, 43, Rue Pierre Valette, MALAKOFF.

nécessaire pour obtenir la dilution 10^{-1} définie précédemment. Le mélange est homogénéisé à l'aide de l'appareil VERTEX à vitesse maximum pendant 2 minutes exactement. Puis la suspension obtenue est répartie en ampoules stériles de 1 ml et conservée congelée à -20° C*. On ne décongélera qu'au moment de l'utilisation. Il sera ensuite nécessaire de titrer la suspension virale en unités-plages PFU (Plaque forming unit). On obtient généralement un titre compris entre 2 et 10×10^9 PFU avec la méthode de plages que nous avons utilisée. Ce titre se conserve plusieurs semaines et même quelques mois mais il a tendance à baisser et il est bon alors de faire une nouvelle série d'inoculations aux souriceaux.

Pour obtenir des plages faciles à voir à l'oeil nu et à compter, plusieurs conditions sont nécessaires. Il faut d'abord diluer le virus de façon convenable puis l'introduire sous un volume approprié sur des cellules préparées à le recevoir.

DILUTION DU VIRUS

Les différents auteurs auxquels nous nous sommes référée utilisent des liquides de dilutions variés. Les uns utilisent le P. B. S. - Tris (152), d'autres un tampon phosphaté (33),

- une infusion de coeur de boeuf (25),
- EAGLE EARLE (117),
- le liquide de HANK'S (96),
- solution GEY (170).

En fait, il semble suffire que le virus soit en milieu tamponné. Nous avons pensé faire les dilutions de virus en liquide de HANKS puisque c'est avec ce liquide que nous avons lavé les cellules avant de les mettre en culture. Mais il aurait fallu alors faire plusieurs dilutions correspondant à chaque milieu étudié :

- Pour le milieu au bicarbonate, utiliser du liquide de HANKS neutralisé au bicarbonate.

- Pour le milieu de Tris, du liquide de HANKS meutralisé au Tris.

- Pour le milieu à l'acide oxalacétique, du liquide de HANKS additionné d'acide oxalacétique et neutralisé à la soude.

Il aurait été difficile d'obtenir des résultats comparables car une dilution de virus n'est pas aussi reproductible qu'une dilution chimique : des erreurs peuvent se produire soit par excès soit par défaut, dues à l'agrégation de

* Equipements Industriels, 1, rue Monticelli, PARIS 14è.

plusieurs virus. C'est pourquoi il est nécessaire, lorsqu'on veut obtenir le titre exact d'une suspension virale, d'utiliser une pipette différente pour effectuer chaque dilution. Nous avons opéré de cette façon pour comparer les résultats obtenus avec des doses différentes.

Pour éviter l'écueil de variations possibles dans trois séries de dilutions, nous avons utilisé un liquide sans bicarbonate ni Tris ni acide oxalacétique, le Tampon + Tampon sérum. Ce liquide a la composition suivante :

Tampon pour virologie :

Chlorure de Sodium	7	g
Phosphate monoacide de Sodium (PO_4HNa_2, $2H_2O$)*	0,68	g
Phosphate diacide de Potassium (PO_4H_2K sec)	0,20	g
Eau distillée ..... q. s. p.	1 000	ml

Ce liquide est réparti en ballons de 150 ml à raison de 90 ml par récipient, que l'on stérilise à + 120 ° C pendant trente minutes.

Tampon sérum : pour 20 ml

Tampon (ci-dessus) phosphaté	15,4	ml
Sérum de cheval filtré	4	ml
Pénicilline à 100 000 U, repris par 5 ml eau	0,5	ml
Streptomycine (1 g dans 5 ml eau)	0,1	ml

Tampon + Tampon-sérum :

8 ml de Tampon + 1 ml de Tampon-sérum.

La suspension virale étant conservée congelée à - 20° C en ampoules scellées de 1 ml sous un volume de 0,5 ml, on décongéle à la température du laboratoire une ampoule juste au moment de l'emploi.

L'ampoule est ouverte stérilement. Avec une pipette de précision stérile on mesure 0,1 ml que l'on porte dans un tube contenant :

Tampon	8,8	ml
Tampon-sérum	1,1	ml

On mélange soigneusement par aspiration successives. Dans une série de tubes, on dispose :

Tampon	8	ml
Tampon-sérum	1	ml

* Si l'on utilise du phosphate monosodique de sodium sec, il faut en peser 0,54 g.

On transporte 1 ml de la première dilution obtenue dans le premier tube de cette série. On mélange. Puis avec une nouvelle pipette, on prélève 1 ml du mélange que l'on porte dans le tube suivant et ainsi de suite. On obtient ainsi des dilutions à 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, etc... de la suspension virale si l'on admet que la suspension conservée titrait 10^{-1}.

Nous avons choisi la dilution à inoculer de façon à ce que le nombre de plages obtenu soit compris entre 20 et 100 afin de pouvoir les compter aisément.

Il est important de déterminer le volume de l'inoculum. Nous avons fait plusieurs essais pour comparer non seulement le rendement en plages mais aussi la facilité d'exécution de la méthode.

Le rendement de l'inoculum a été déjà étudié par de très nombreux auteurs (86, 96, 171). Nous nous sommes attachés à chercher surtout la commodité de mesure du volume d'une part, et de la répartition d'autre part. Les essais ont été réalisés avec des volumes allant de 0,1 ml à 2 ml.

Nous nous sommes aperçue rapidement que la répartition sur les cultures dont nous avions seulement éliminé le milieu de culture, donnait des résultats très irréguliers avec la même dose d'inoculum.

Nous avons pensé un moment que ce phénomène était dû à une différence possible de volume de milieu restant malgré l'égouttage soigneux de la culture. En fait, il sembla plutôt que les produits du métabolisme cellulaire soient toxiques soit pour les cellules soit pour les virus et inhibent ainsi plus ou moins la multiplication des virus dans les cellules, comme l'ont remarqué MAYER et SOKOL et quelques autres (64, 145, 152). Il est donc nécessaire de laver soigneusement la culture cellulaire avant d'y introduire l'inoculum afin d'éliminer ces substances inhibitrices.

Les lavages ont été faits avec quelques ml de liquide de HANKS correspondant au milieu de culture utilisé :

- Liquide de HANKS au bicarbonate,
- Liquide de HANKS au Tris,
- Liquide de HANKS à l'acide oxalacétique neutralisé à la soude.

Deux lavages suffisent à obtenir des résultats rigoureusement comparables sur un grand nombre d'essais (96).

2. VOLUME DE L'INOCULUM ET INOCULATION

On peut alors répartir l'inoculum sur les cultures cellulaires égouttées. Les volumes d'inoculum étant compris entre 0,1 ml et 2 ml pour un temps de fixation identique nous ont montré les résultats suivants.

Un volume de 0,1 ml est extrêmement difficile à répartir sur toute la surface de la culture. Il se produit une fixation importante en masse à l'endroit du dépôt qui donnera ultérieurement des plages coalescentes, c'est-à-dire qui ont tendance à se recouvrir les unes les autres, alors que le reste de la préparation montre peu de plages sauf à l'endroit où le faible volume a pu couler. De plus, si le temps de fixation est un peu long, la culture se déssèche. Ultérieurement, elle montrera des signes de souffrance qui rendront la lecture plus difficile (cellules arrondies, bords décollés, décoloration du milieu). Dans les flacons du type de pharmacie, l'inoculum est accumulé au centre de la préparation, tandis que dans les boîtes de PETRI il a tendance à se cantonner dans une sorte de rigole qui se forme à la périphérie.

Pour toutes ces raisons, il apparaît que le volume permettant la meilleure lecture et la meilleure conservation soit supérieur à 0,5 ml. Et dans la mesure où nous avons adopté le principe de ne pas éliminer l'inoculum pour couler le milieu solide, un volume supérieur à 1,5 ml diminue le pouvoir gélifiant de celui-ci et risque d'entraîner son décollement du support. Nous avons donc finalement adopté pour tous nos essais un volume de 1 ml exactement mesuré.

3. TEMPS D'INCUBATION

Le temps d'incubation nécessaire à la fixation des virus a été suffisamment étudié par différents auteurs pour que nous n'y revenions pas (85, 95). Nous avons seulement vérifié que ces travaux étaient applicables au virus SINDBIS. En effet, après quarante cinq minutes de fixation tous les virus qui doivent se fixer le sont, car on n'obtient pas de résultats supérieurs en augmentant la durée d'incubation.

Temps d'incubation	Nombre de plages
15 minutes	13 - 15
30 minutes	26 - 25 - 23
45 minutes	35 - 37 - 37
1 heure	37 - 39 - 37
1 heure 30	35 - 39 - 37
2 heures	36 - 39 - 38

Nous avons donc adopté un temps d'incubation de soixante minutes, temps relativement court qui convient en général aux ARBO Virus* du groupe A (170).

*Appelés maintenant : Encéphalovirus.

CHAPITRE VI

MILIEU SOLIDE

1. MILIEU NUTRITIF LIQUIDE - Nécessité d'enrichissement par
   - EXTRAIT EMBRYONNAIRE
   - VITAMINES
2. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS AVEC
   - LE BICARBONATE
   - LE TRIS
   - L'ACIDE OXALACETIQUE AVEC OU SANS GAZ CARBONIQUE
3. MILIEU GELIFIANT - Utilisation de
   - GELOSE
   - AGAROSE
   - METHYL-CELLULOSE
   - AMIDON

Le virus SINDBIS étant cytopathogène pour les cellules d'embryon de Poulet, il est nécessaire de l'immobiliser par un milieu solide pour éviter sa propagation qui aboutirait à la lyse de toute la culture.

La nature de ce milieu solide est capitale pour l'obtention des plages. Il doit contenir :

- Un milieu de culture favorisant à la fois les cellules d'embryon de Poulet et les virus,
- un milieu solide suffisamment gélifiant,
- un colorant permettant une lecture facile.

1. MILIEU NUTRITIF LIQUIDE

Ce milieu doit être très riche car les cellules doivent y trouver tous les éléments qui leur sont nécessaires pendant plusieurs jours puisqu'on ne pourra plus changer le milieu jusqu'à la fin de l'expérience.

Pour remédier à cet inconvénient, quelques auteurs ont proposé de rajouter du milieu nutritif en cours d'expérience puisqu'il n'est pas possible de le changer sans risque de léser la culture cellulaire. Ainsi BUSSEL et Coll. coulent d'abord une couche de 6 ml de gélose puis le quatrième jour une seconde couche de 4 ml et le huitième jour, une troisième couche qui contient le colorant. WINOCOUR et SACHS (258) coulent une première couche de gélose de 8 ml après l'incubation, puis sept jours après une nouvelle couche de 2, 5 ml qui contient le colorant.

Ces techniques ont l'avantage de préserver les cellules de la toxicité éventuelle du colorant. Elles sont très certainement intéressantes lorsque l'apparition des plages demande une dizaine de jours. Avec le virus SINDBIS, la lecture au troisième jour permet de se contenter d'une seule couche de gélose nutritive.

Certains auteurs utilisent l'hydrolysat de caséine (130), d'autres l'hydrolysat de lactalbumine (114, 170).

Nous avons dû renoncer à l'emploi de l'hydrolysat de caséine qui semblait incapable d'assurer la nutrition des cellules.

Finalement, nous avons adopté le milieu proposé par HANNOUN et PANTHIER (95, 96) contenant :

- Milieu de PARKER (concentration double) 1 partie,
- milieu de HANK'S (concentration double) 1 partie,

- Sérum de veau 5 %

- extrait embryonnaire 2, 5 %

Nous avons préparé l'extrait embryonnaire suivant la technique de PORTERFIELD (71) légèrement modifiée comme suit.

Après l'élimination des pattes, têtes et viscères d'embryons de poulets de dix à quatorze jours, on introduit les corps embryonnaires dans une fiole stérile où ils sont hachés à l'aide de ciseaux stériles. On transvase dans le récipient stérile de l'homogénéiseur VERTEX* que l'on fait tourner à la vitesse maximale pendant deux minutes. Puis l'extrait est centrifugé à 2 000 tours/minute pendant trente minutes à la centrifugeuse réfrigérée** à + 4° C. Si l'on conserve l'extrait embryonnaire, on le place au congélateur et avant de l'employer on le centrifuge une fois encore à 2 000 tours/minute pendant dix minutes immédiatement avant l'emploi.

Cette technique d'obtention d'extrait embryonnaire étant assez longue et coûteuse, nous avons essayé de le remplacer par le mélange de vitamines proposé par EAGLE (66, 97), à savoir :

Chlorhydrate de Thiamine	3, 4	mg
Riboflavine	0, 38	mg
Pantothénate de Calcium	4, 80	mg
Chlorhydrate de Pyridoxal	1, 9	mg
Nicotinamide	1, 2	mg
Chlorhydrate de Choline	1, 4	mg
Biotine	2, 4	mg
Mesoinositol	5, 4	mg
Acide folique	4, 4	mg

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée. Il peut se produire une légère opalescence.

Stériliser à + 120° C, vingt minutes.

Conserver à - 20 ° C.

Cette solution se conserve parfaitement et permet d'abandonner l'extrait embryonnaire que nous avons remplacé par 1 % de vitamines. Les essais comparés avec extrait embryonnaire et vitamines, nous ont donné les résultats suivants.

*Equipements Industriels, 1, rue Monticelli, PARIS 14è.

**Centrifugeuse RUHNE.

ESSAIS	EXTRAIT EMBRYONNAIRE 2,5 %	VITAMINES 1 %
Essai 1	118 - 123 - 120	110 - 112 - 115
Moyenne	120	112
Essai 2	106 - 96 - 86	96 - 98 - 96
Moyenne	96	96
Essai 3	90 - 92 - 89	90 - 85 - 95
Moyenne	90	90
Essai 4 - Moyenne	35	30
Essai 5	200 - 202	200 - 210
Moyenne	201	205

Ce tableau montre bien qu'il n'y a aucune différence significative entre l'emploi de 1 % de vitamines de EAGLE ou de 2,5 % d'extrait embryonnaire.

Pour la suite des expériences, nous avons donc retenu l'emploi de 1 % de vitamines de EAGLE.

Puis en utilisant comme gélifiant de la gélose à 30 o/oo dans l'eau distillée et comme colorant le rouge neutre à 1 p 10 000, nous avons continué nos essais en milieux bicarbonatés et non bicarbonatés.

Le milieu solide coulé à la surface de la culture doit être parfaitement homogène. En effet, la moindre surépaisseur ou le moindre plissement risque de masquer les plages ou de déchirer la couche cellulaire.

La gélose est fondue puis refroidie lentement jusqu'à + 40° C. L'addition des milieux liquides à la température du laboratoire risquererait de provoquer des coagulations partielles. On réchauffe donc les liquides au bain-marie à + 40° C avant de faire le mélange. A cette température, la prise en masse survient rapidement. Pour pallier cet inconvénient, on ne prépare que de petites quantités à la fois, par exemple le volume nécessaire à cinq ou six flacons ou une dizaine de boîtes de PETRI au maximum.

On prépare donc les milieux liquides suivants :

1) MILIEU BICARBONATE

HANKS double (neutralisé au bicarbonate)..... 10 ml

PARKER double (neutralisé au bicarbonate)..... 10 ml

Sérum de veau..... 2 ml

Vitamines ..... 0,4 ml

On réchauffe au bain-marie à + 40° C puis au moment de l'emploi, on ajoute 20 ml de gélose à 30 o/oo colorée au rouge neutre, fondue et maintenue au bain-marie à + 40° C.

2) MILIEU NON BICARBONATE AU TRIS

HANKS double non neutralisé..... 10 ml

PARKER double non neutralisé..... 10 ml

Solution concentrée de Tris..... 0,4 ml

Soude $\frac{N}{4}$ q. s. p. rouge orangé .....

Sérum de veau ..... 2 ml

Vitamines ..... 0,4 ml

Puis on procède comme précédemment.

3) MILIEU NON BICARBONATE A L'ACIDE OXALACETIQUE

HANKS double non neutralisé ..... 10 ml

PARKER double non neutralisé ..... 10 ml

Solution concentrée d'acide oxalacétique ..... 0,4 ml

Soude $\frac{N}{4}$ q. s. p. rouge orangé

Sérum de veau ..... 2 ml

Vitamines ..... 0,4 ml

Puis on procède comme précédemment.

On peut, bien entendu, préparer à l'avance les milieux de PARKER et HANK'S doubles avec respectivement 2 % de Tris ou d'acide oxalacétique et les neutraliser à la soude $\frac{N}{4}$ en présence de Rouge de Phénol.

Pour la répartition de ce milieu solide, on utilise une pipette de 10 ml dont l'extrémité a été sciée de façon à obtenir un écoulement rapide. La force du jet de la pipette est suffisantepour décoller le tapis cellulaire : il faut donc prendre soin de ne pas diriger la pipette sur la culture elle-même mais sur une paroi du récipient, pourtour de la boîte de PETRI, ou côté opposé à la culture dans les flacons.

Immédiatement après avoir coulé le milieu solide on dispose la cul-

ture sur une surface parfaitement horizontale pour obtenir une couche d'égale épaisseur. Ceci est très important car l'influence de l'épaisseur de la couche de milieu nutritif solide n'est pas négligeable comme nous le verrons plus loin.

Après solidification du milieu, boîtes et flacons sont retournés de façon à ce que le milieu gélosé soit à la partie supérieure du récipient. Ainsi la lecture ne risque pas d'être gênée par l'eau de condensation. Flacons et boîtes sont ensuite placés à l'étuve à + 37° C $\pm$ 0, 5° C.

Après vingt quatre heures, on peut distinguer en transparence ou en éclairage rasant les plages mais de taille si petite (1/2 mm de diamètre) qu'il serait difficile de les compter.

Après quarante huit heures, les plages sont très visibles sans aucun artifice et on peut les compter en disposant flacons et boîtes sur une feuille de papier blanc ou sur le support du visionneur Compteur* qui enregistre le nombre de points faits avec le stylet encreur.

Ces plages sont de deux types, petites plages de 2 mm de diamètre environ et grandes plages de 4 à 6 mm de diamètre dans une proportion de 50 %, ce qui serait dû à la mutation régulière du virus ainsi que l'ont montré HANNOUN et PANTHIER (95), ou à l'action d'un facteur inhibiteur du milieu solide (46).

Nous avons réuni quelques uns de nos résultats dans les graphiques suivants (I à XII).

* PARIS-LABO, 7, rue du Cardinal Lemoine, PARIS 5è.

2. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES DIFFERENTS MILIEUX

Conclusions portant sur ces graphiques dans la zone qui paraît intéressante, c'est-à-dire entre 20 et 100 plages.

Graphiques

I Tris + CO_2 > bicarbonate + CO_2 > O. A. A. > bicarbonate

II Tris + CO_2 > bicarbonate + CO_2 > O. A. A.

III O. A. A. >> Tris + CO_2

IV Tris + CO_2 > bicarbonate + CO_2 > O. A. A.

V Tris + CO_2 > O. A. A. 1 seul chiffre : bicarbonate > Tris > O. A. A.

VI O. A. A. > Tris + CO_2

VII bicarbonate > Tris + CO_2 > O. A. A.

VIII O. A. A. > Tris + CO_2 >> bicarbonate

IX bicarbonate > O. A. A. > Tris + CO_2

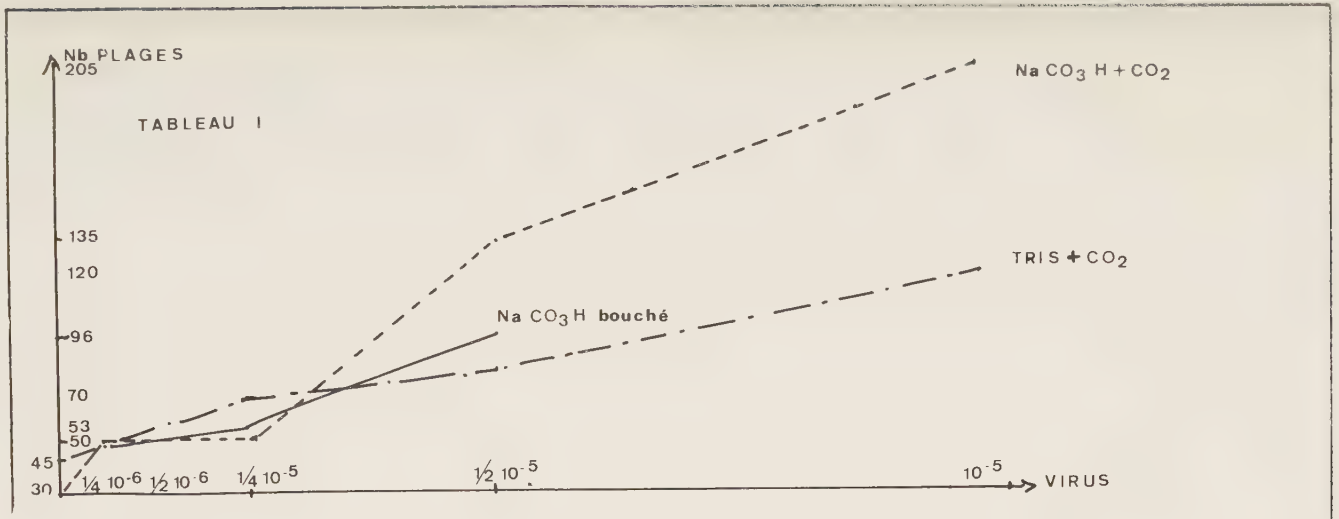
X bicarbonate > O. A. A.

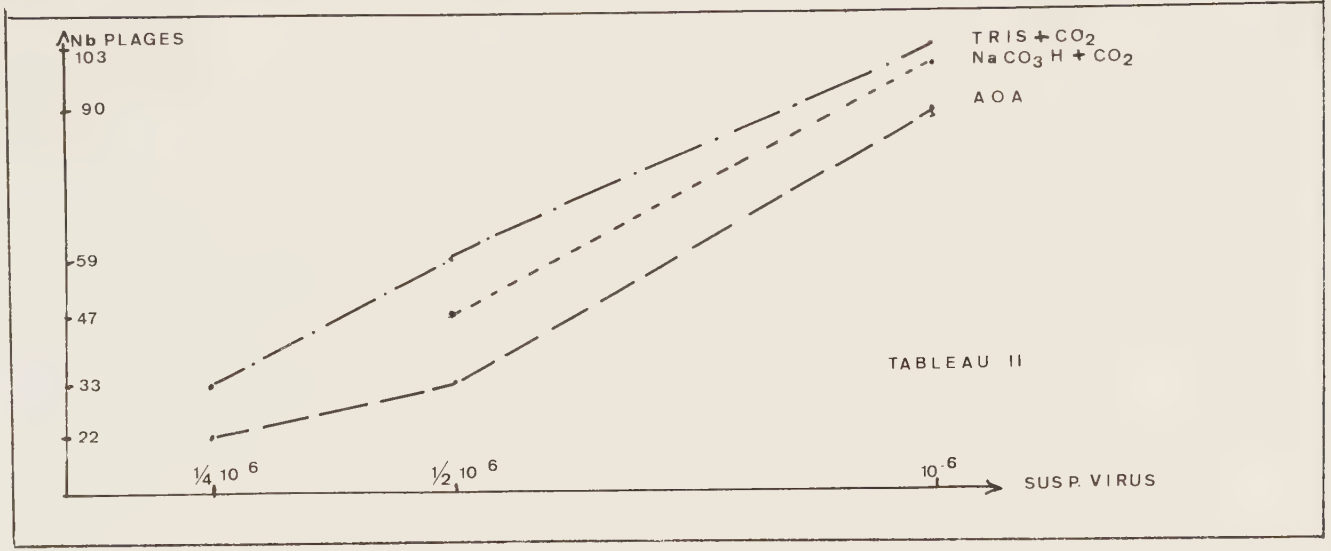
XI Tris - bicarbonate

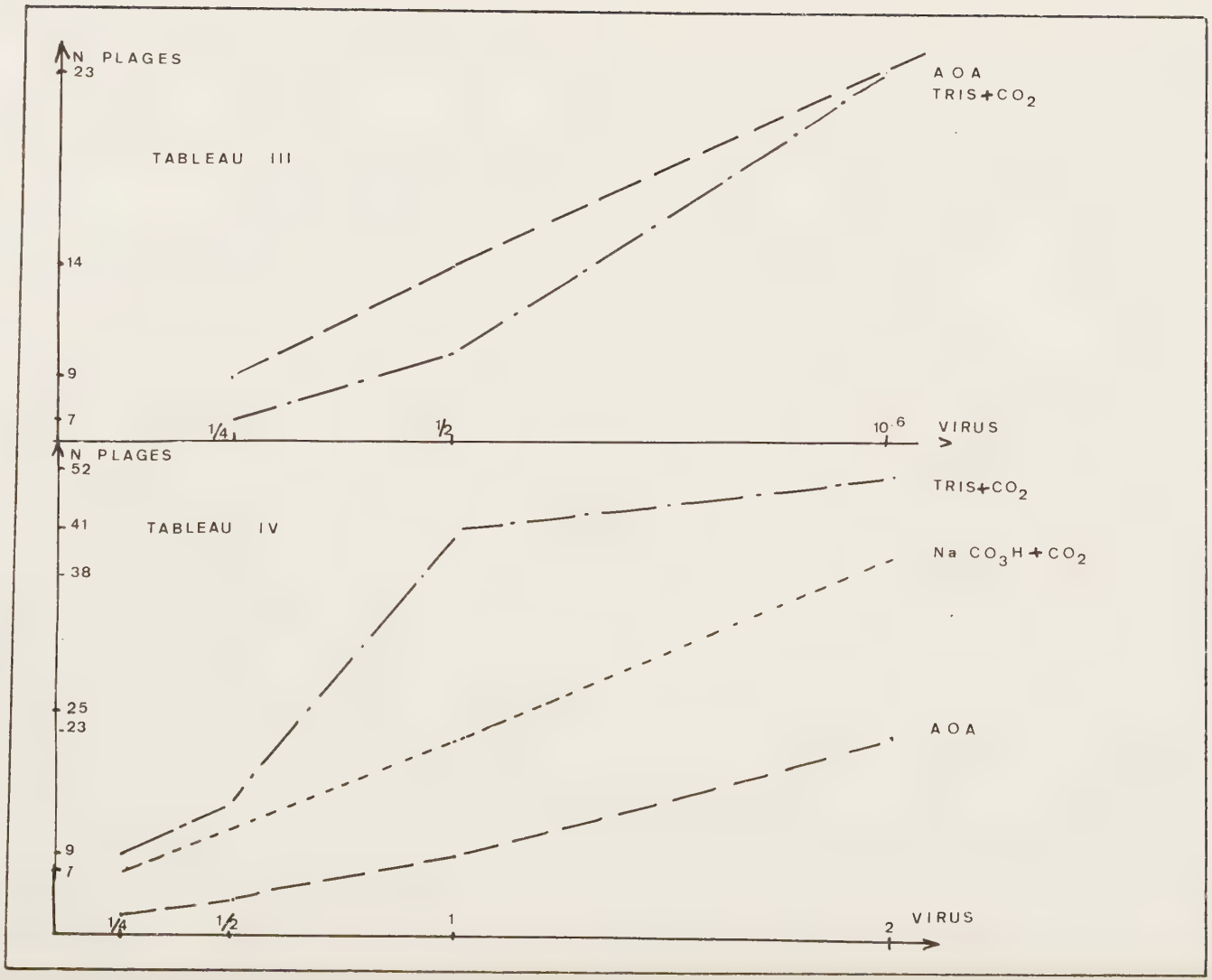
XII bicarbonate > Tris + CO_2 > O. A. A.

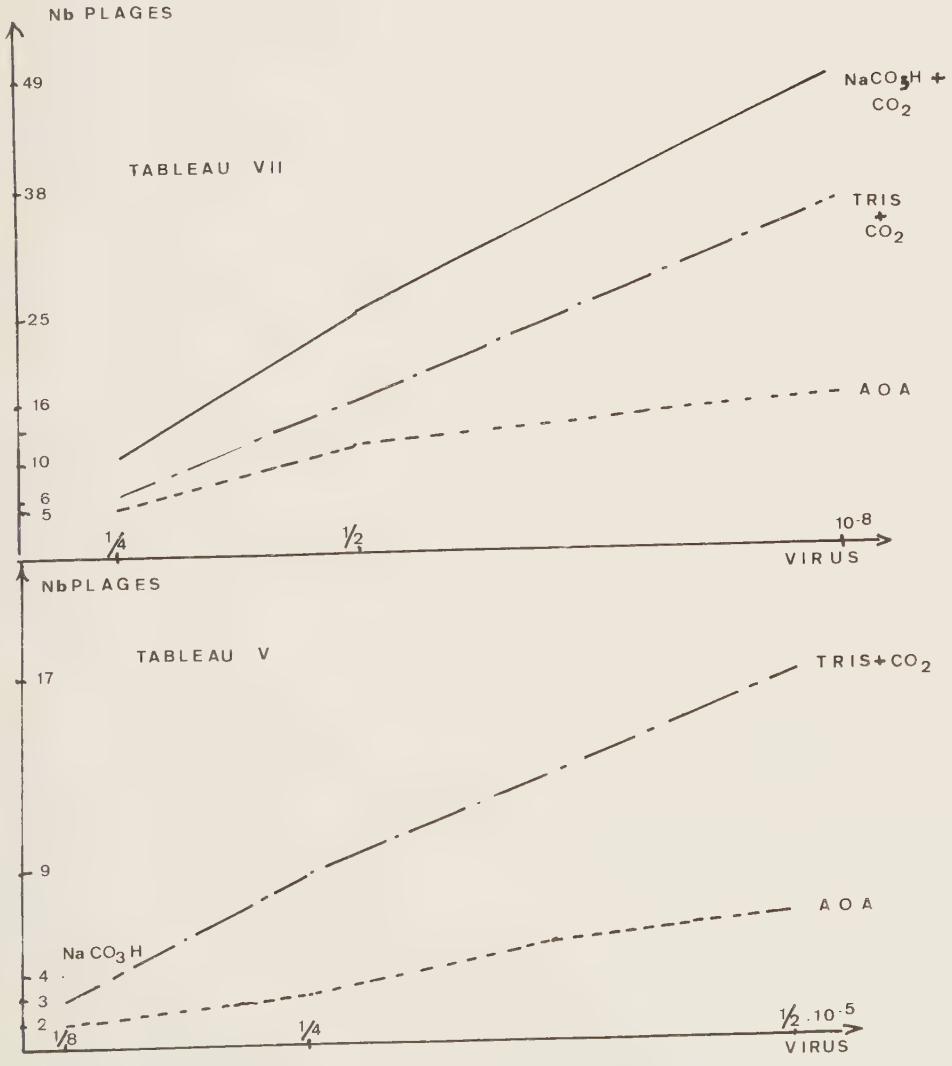
Ces différents résultats montrent que quantitativement on obtient un meilleur rendement en utilisant les milieux au Tris ou au bicarbonate plutôt qu'à l'acide oxalacétique. Mais si parfois le nombre de plages obtenu avec le milieu bicarbonaté en boîtes de PETRI était supérieur à celui obtenu avec le milieu au Tris, nous avons toujours remarqué que les premières se conservaient beaucoup moins bien que les secondes. De sorte que si pour une raison ou pour une autre la lecture ne peut se faire exactement quarante huit heures après l'inoculation du virus, l'essai est le plus souvent illisible en milieu bicarbonaté sous gaz carbonique, alors qu'il est encore très net en milieu au Tris.

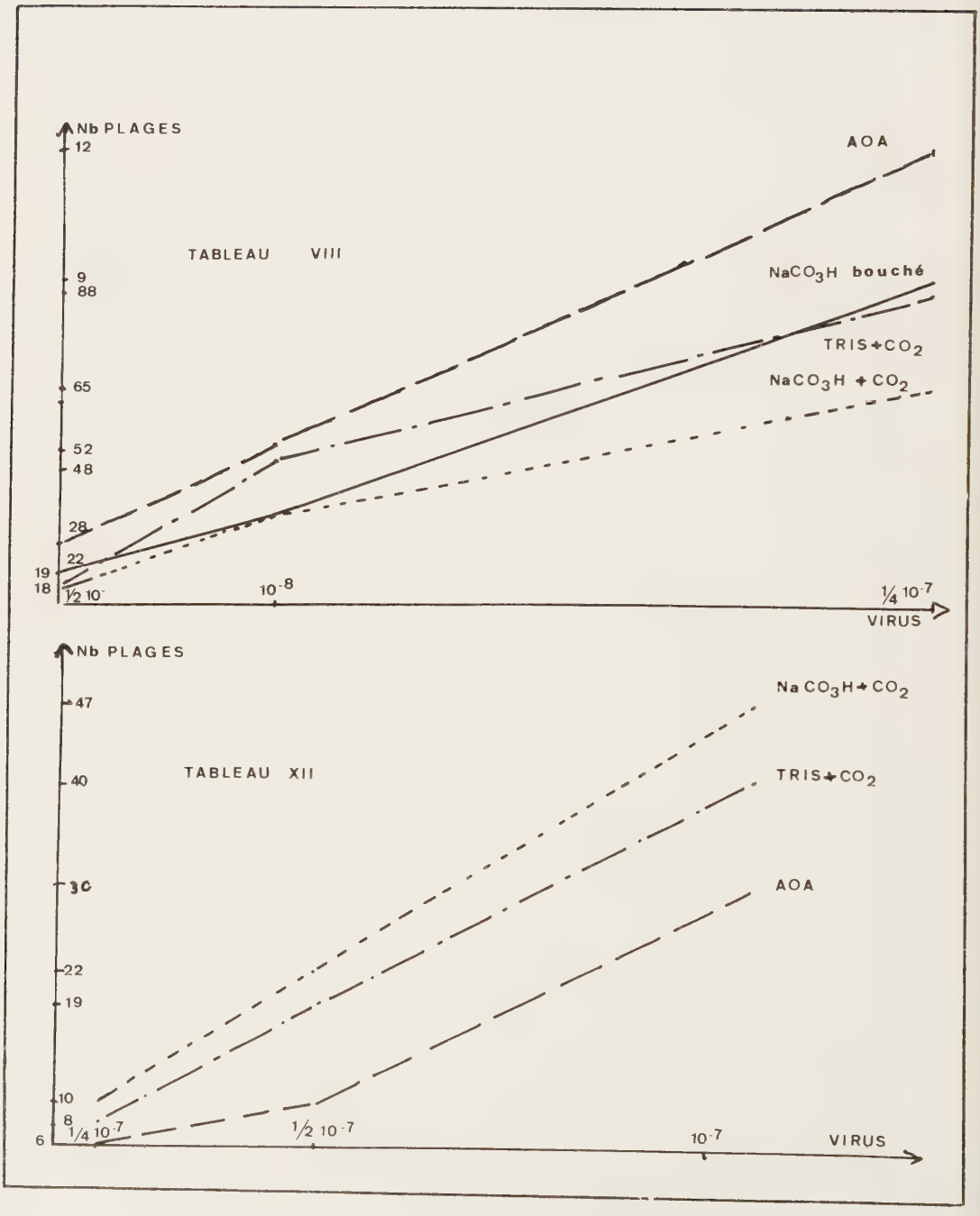
Pour ces différentes raisons, nous concluons que la méthode la plus pratique consiste à utiliser un milieu au Tris en boîte de PETRI placés dans une atmosphère enrichie en gaz carbonique pour l'obtention des plages.


Nb PLAGES
205
TABLEAU I
135
120
96
70
53
50
45
30
Na CO3 H + CO2
TRIS + CO2
Na CO3 H bouché
¼ 10-6
½ 10-6
¼ 10-5
½ 10-5
10-5
VIRUS


Nb PLAGES
103
90
59
47
33
22
TRIS + CO2
Na CO3 H + CO2
AOA
TABLEAU II
¼ 10 6
½ 10 6
10-6
SUSP. VIRUS


N PLAGES
23
14
9
7
TABLEAU III
AOA
TRIS+CO2
1/4
1/2
10-6
VIRUS
N PLAGES
52
41
38
25
23
9
7
TABLEAU IV
TRIS+CO2
Na CO3H+CO2
AOA
1/4
1/2
1
2
VIRUS


Nb PLAGES
49
38
25
16
10
6
5
TABLEAU VII
NaCO3H + CO2
TRIS + CO2
AOA
1/4
1/2
10-8
VIRUS
NbPLAGES
17
9
4
3
2
TABLEAU V
TRIS+CO2
AOA
Na CO3 H
1/8
1/4
1/2 .10-5
VIRUS

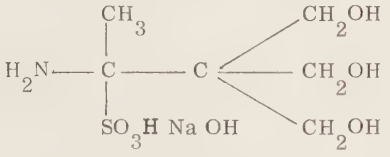

Nb PLAGES
12
9
88
65
52
48
28
22
19
18
TABLEAU VIII
AOA
NaCO3H bouché
TRIS+CO2
NaCO3H + CO2
½ 10-8
10-8
¼ 10-7
VIRUS
Nb PLAGES
47
40
30
22
19
10
8
6
TABLEAU XII
NaCO3H+CO2
TRIS+CO2
AOA
¼ 10-7
½ 10-7
10-7
VIRUS

T. E. S.

Récemment, RICHTER (192) a proposé un produit proche du tris, à pouvoir tampon similaire : le T. E. S.. Il nous a paru intéressant d'en faire l'essai car ce T. E. S. permettrait la culture cellulaire en l'absence de gaz carbonique.

Le T. E. S. est l'acide Tris (hydroxy -méthyl) méthyl amino éthane-sulfonique.

La solution concentrée, préparée dans les mêmes conditions que celle de Tris, contient une molécule-gramme de T. E. S. par litre, soit 229 g/l.



Le milieu de culture est préparé extemporanèment avec le milieu à l'hydrolysat de caséine concentré de l'Institut Pasteur..... 1 ampoule

Solution concentrée de T. E. S. ..... 2,75 ml

Rouge de Phénol à 0,1 % ..... 1,5 ml

Eau bidistillée stérile..... 450 ml

Solution de soude normale q. s. p. neutralité au Rouge de Phénol.

Ce tampon, d'après RICHTER, aurait un pk plus physiologique que le Tris (190). Il posséde un très grand avantage, celui de permettre une culture en étuve ordinaire sans nécessité d'enrichir l'air en anhydride carbonique.

ASPECT MICROSCOPIQUE DES CULTURES

Après quarante huit heures, les fibroblastes ont une morphologie normale, comparable en tous points à celle des cellules cultivées avec bicarbonate de sodium en présence de gaz carbonique que nous avons prises comme référence.

Les plages obtenues avec un milieu au T. E. S. sont comparables pour la forme et la taille à celles que l'on obtient avec les autres milieux. Leur nombre, toutefois, n'atteint pas celui des cultures témoins : il est environ moitié moindre. Il serait probablement possible d'améliorer ces résultats en déterminant la dose exactement requise par le système cellulaire. Celle-ci doit être vraisemblablement plus faible que celle que nous avons utilisée.

MILIEU GELIFIANT

Plusieurs milieux solides peuvent être utilisés pour immobiliser le virus dans la culture cellulaire. Nous avons été amenée à en essayer plusieurs car le premier utilisé, la gélose purifiée DIFCO (Noble Agar) ne nous donnait pas satisfaction.

En effet, alors que nous savions être en possession d'une suspension virale de titre élevé nous n'obtenions que quelques plages irrégulières, inconstantes et non reproductibles. De nombreux auteurs ayant remarqué un phénomène d'inhibition des plages par la gélose (27, 46, 137, 158, 189, 203, 233), nous avons cherché quels milieux sont susceptibles de faciliter l'apparition des plages au lieu de l'inhiber. D'après COLTER, l'inhibiteur présent dans la gélose serait un polysaccharide sulfaté (46).

Suivant les conseils de WALLIS, MELNICK et BIANCHI (245), nous avons essayé la gélose ordinaire DIFCO "Bacto-Agar" qui s'est révélée moins inhibitrice que la "Noble Agar" puisque c'est avec elle que nous avons conduit nos essais portant sur les milieux nutritifs.

Nous avons encore essayé la gélose OXOID (Agar n° 3), puis la méthyl cellulose, l'amidon et l'agarose.

GELOSE

CONCENTRATION DE LA GELOSE

Le gel que nous cherchons à obtenir doit posséder deux qualités qui vont à l'encontre l'une de l'autre. Il faut en effet qu'il soit le plus léger possible pour permettre une bonne diffusion du milieu nutritif, les cultures cellulaires étant très exigeantes de ce côté, et d'autre part qu'il soit suffisamment compact pour empêcher la diffusion des virus hors des cellules infectées et éviter la lyse cellulaire en zones importantes. De plus, sa solidité doit être telle que l'on puisse retourner le flacon ou la boîte sans risquer de le voir couler soit dans le transport soit dans la chaleur de l'étuve.

De nombreux auteurs américains proposent la concentration de 9 g °/₀₀ ce qui conduit à une concentration finale de 4 g % (48).

ELLEM ..... 10 °/₀₀ (69)

FRANKLIN..... 8,5°/₀₀ (78)

NOMURA..... 15 °/₀₀(156)

LWOFF, DULBECCO et VOGT proposent une concentration finale de 10 °/₀₀(145).

Avec la gélose commercialisée en France, ces titres nous ont paru tout à fait insuffisants. En effet à cette concentration, le gel est encore semi liquide et ne supporte pas la manipulation et encore moins le retournement ; finalement nous avons adopté une concentration de 30‰ qui, après le mélange à parties égales avec le milieu liquide conduit à une concentration finale de 15 °/₀₀

QUANTITE DE GELOSE

L'épaisseur de la couche gélosée est extrêmement importante comme l'a démontré BARON (11) en utilisant des cultures en tubes gélosés : là où l'épaisseur de la gélose est insuffisante, il n'y a pas de plages. De même au fond du tube ou l'épaisseur est maximale, les plages n'apparaissent pas. La quantité de milieu gélosé à couler dépend donc du récipient utilisé. Pour notre part; nous avons choisi les mêmes quantités pour le milieu liquide de culture cellulaire et le milieu solide, c'est à dire 5 ml pour les boîtes de Petri, 10 ml pour les flacons de 90 ml et 12,5ml pour les flacons de 125ml.

QUALITE DE LA GELOSE

Même lorsque la gélose paraît convenir, il est certain qu'elle contient un inhibiteur et que cet inhibiteur agirait au niveau de la fixation des virus dans les cellules (56) tout au moins pour les herpès virus, vaccine et SINDBIS. Nous avons essayé pour notre part d'attendre vingt quatre heures avant de couler le milieu gélosé sur les cellules infectées. Dans ce cas, pour que l'essai soit significatif, il faut bien entendu éliminer le liquide de suspension virale et soigneusement rincer la préparation pour être certain que l'augmentation possible du nombre de plages ne soit pas dûe à une fixation tardive de virus restant dans la suspension. D'autre part, il faut éviter la présence d'un milieu liquide qui pourrait favoriser la dispersion des virus.

Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants:

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose coulée immédiatement	Moyenne	Gélose coulée après 24 heures	Moyenne
10^{-5}	10 - 15	13	21 - 23	22
$1/2.10^{-5}$	5 - 9 - 5	7	16 - 15 - 14	15

qui semblent bien montrer que la gélose contient une substance inhibant la formation des plages au début du phénomène.

Les différents modes de préparation de la gélose chez divers fabricants conduisent à des géloses contenant plus ou moins de substance inhibitrice.

Certains auteurs ont proposé d'utiliser un anti-inhibiteur, c'est à dire une substance capable de neutraliser le pouvoir inhibiteur de la gélose. VAHERI et PAGANO proposent le DEAED : di Ethyl Amino Ethyl Dextran (240).

D'autres auteurs rapportent l'insuccès de la production de plages à divers facteurs absents du milieu, par exemple l'arginine (18), d'autres à des facteurs inhibiteurs autres que ceux de la gélose mais dûs au sérum de veau (39, 136, 171), d'autres à la nature du système cellules-virus(105, 243).

AGAROSE

La gélose la plus purifiée devrait être exempte de cette substance inhibitrice. C'est pourquoi nous avons essayé d'utiliser l'Agarose* comme produit gélifiant qui s'est révélé être le produit de référence pour l'obtention du plus grand nombre de plages, donc du titre le plus exact de la suspension virale.

En comparant la gélose à l'agarose, nous avons obtenu les résultats suivants:

*Industrie biologique Française

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Agarose	Moyenne
10^{-7}	10 - 13 - 13 - 16	13	74 - 86 - 76 - 80	79
$1/4.10^{-6}$	80 - 83 - 84	82	253 - 247 - 250	250

Ces résultats quantitatifs montrent la supériorité de l'agarose.

D'autre part, du point de vue qualitatif, l'agarose donne de bien plus beaux résultats. Les plages sont plus régulières, plus grandes, rigoureusement circulaires et les bords en sont particulièrement bien délimités (à l'oeil nu). Voir photographies

Malheureusement l'agarose est une substance coûteuse qui ne permet pas les essais de routine mais nous l'avons retenu comme produit de référence, se prêtant le mieux à la technique des plages.

METHYL-CELLULOSE

Nous avons donc cherché à utiliser un produit gélifiant d'un prix abordable ne contenant pas de substances inhibitrices comme la gélose. C'est ainsi que nous avons essayé la méthyl-cellulose utilisé par RAPP (189), SCHULZE (203), HOTCHIN (112) selon la méthode proposée par SCHULZE et Coll. (203), en l'adaptant à notre propre technique.

La méthyl-cellulose est d'abord lavée et séchée à l'alcool éthylique puis à l'éther. Puis nous avons préparé un gel de méthyl-cellulose 4 000 centipoises à 4 % dans l'eau distillée, stérilisé à + 120°C pendant vingt minutes.

A ce gel réchauffé à + 40°C nous avons ajouté le milieu nutritif double à parties égales. Le gel obtenu est assez fluide et ne supporterait en aucun cas le retournement. Nous avons donc essayé de le rendre plus solide soit en augmentant le titre de méthyl-cellulose, soit en ajoutant une couche de gélose vingt quatre heures après la couche de méthyl-cellulose.

En faisant varier de 3 g à 7 g % la concentration du gel, nous n'avons pu obtenir un milieu suffisamment rigide pour permettre le retournement. Cependant la lecture était relativement facile, car avec quelques précautions, le glissement du gel n'entraîne pas la couche cellulaire.

Nous avons donc essayé de couler une seconde couche de gélose vingt quatre heures après celle de méthyl-cellulose. De cette façon, la gélose se mélange au gel de méthyl-cellulose mais d'après nos précédentes expériences, n'inhibe plus la formation des plages. Avec 9 ml de milieu gélosé, nous avons obtenu un milieu suffisamment solide pour permettre les manipulations de lecture sans incidents.

En règle générale, nous avons obtenu de meilleurs résultats quantitatifs avec la méthyl-cellulose qu'avec la gélose, comme le montrent les tableaux suivants.

Tableau XIII

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Methyl-cellulose	Moyenne
$1/2.10^{-4}$	115 - 111	113	182 - 143	162
$1/4.10^{-4}$	65 - 62 - 58	60	86 - 75 - 80	79
10^{-5}	25 - 23 - 23	24	49 - 43 - 44	46
$1/2.10^{-5}$	16 - 8 - 7	10	24 - 33 - 27 - 36	30

Tableau XIV

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Méthyl-cellulose	Moyenne
$1/4.10^{-4}$	170-163-134-160	157	270	275
10^{-5}	70-77-70-70	72	144-165-159	156
$1/2.10^{-5}$	42-40-45	40	90-84-84	86

Tableau XV

	NOMBRE DE PLAGES					
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Méthyl-cellulose	Moyenne	Gélose après 24 h	Moyenne
10^{-5}	10-15	12	26-24	25	21-23	22
$1/2.10^{-5}$	5-8-3	6	12-11	12	16-15-14	15

Tableau XVI

Dilution virale	Gélose	Moyenne	Méthyl-cellulose	Moyenne
10^{-8}	12 - 10 - 9	10	15 - 13 - 18	15
$1/4.10^{-7}$	23 - 23	23	30 - 35 - 36	34
$1/2.10^{-7}$	53 - 52	52	60 - 55	58

Les tableaux n° XIV, XV et XVI montrent que l'on obtient un nombre de plages bien supérieur en utilisant un gel de méthyl-cellulose au lieu de la gélose. L'amélioration est comprise entre 20 et 100 % ce qui n'est pas négligeable mais tout de même peu constant.

Les tableaux suivants exposent les résultats obtenus avec différents titres de méthyl-cellulose.

Tableau XVII

La dilution virale est ici la même pour chaque essai, à savoir $1/2.10^{-7}$

	NOMBRE DE PLAGES	MOYENNE
Gélose	85-- 93 - 74 - 80	83
Méthyl-cellulose à 3 g %	73 - 81 - 80	78
4 g %	80 - 98	89
5 g %	116 - 95 - 81 - 120	103
6 g %	78 - 79 - 89 - 109	86
7 g %	62 - 93 - 60 - 70	71

Tableau XVIII

La dilution virale est ici encore uniforme : $1/4.10^{-7}$

	NOMBRE DE PLAGES	MOYENNE
Gélose	37 - 36 - 35	36
Méthyl-cellulose à 4 g %	25 - 24 - 20 - 18	22
5 g %	36 - 42 - 38	39
6 g %	47 - 43 - 51	47
7 g %	45 - 40	43

Ces deux tableaux n° XVII et XVIII montrent que la concentration en méthyl-cellulose donnant le meilleur rendement en plages se situe aux environs de 5 à 6 g . On obtient ainsi une amélioration de 20 à 25 % par rapport à la gélose.

SCHULZE et SCHLESINGER ont essayé différentes concentrations de 0,5 %, 1 % et 3 % et ont trouvé qu'à 3 % le milieu plus solide donnait des plages plus petites, alors que les faibles concentrations provoquaient des plages confluentes ou diffuses. Ils concluent à la possibilité d'une relation inverse entre la viscosité du milieu et la taille des plages, ce qui paraît d'ailleurs tout à fait logique, puisque le but du milieu solide est précisément

d'empêcher ou de retarder la diffusion du virus en dehors des cellules infectées.

Il est possible que la différence existant entre nos résultats et ceux de ces auteurs provienne de l'origine différente de la Méthyl-cellulose.

En ajoutant une couche de 9 ml de milieu gélosé 24 heures après la couche de méthyl-cellulose à 5 %, nous avons obtenu des résultats comparables en tous points :

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Méthyl-cellulose + gélose	Moyenne
10^{-7}	35 - 35 - 37 - 35	35	43 - 45	44
2.10^{-7}	60 - 81 - 60	67	76 - 111 - 97	94

Autre essai :

	NOMBRE DE PLAGES			
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Méthyl-cellulose + Gélose	Moyenne
$1/4.10^{-5}$	113 - 104 - 110	109	144 - 138	142
10^{-6}	50 - 43 - 51	41	58 - 60	59
$1/2.10^{-6}$	24 - 26 - 31	27	40 - 29 - 30	33

L'addition de ce milieu gélosé rendant la lecture infiniment plus facile, nous l'avons adoptée pour la suite des essais dans la comparaison des milieux à l'amidon à la méthyl-cellulose et à l'agarose.

SCHULZE et SCHLESINGER (203) proposent aussi cette méthode pour faciliter la lecture. DE MAEYER et SCHONE (56) préfèrent enlever la couche de méthyl-cellulose en l'aspirant avant de couler le milieu gélosé. Cette dernière technique nous a paru plus longue et plus délicate.

Comparaison de la méthyl-cellulose à l'agarose :

	NOMBRE DE PLAGES					
Dilution virale	Gélose	Moyenne	Agarose	Moyenre	Méthyl-cellulose + gélose	Moyenne
10^{-7}	10-13-13-16	13	74-86-80-76	78	61-62	61
$1/4.10^{-6}$	80-83 84	82	253-247-250	250	150-160-210	173

Autre essai :

	NOMBRE DE PLAGES		
Dilution virale	Gélose	Agarose	Méthyl-cellulose
10^{-7}	69	74	75

AMIDON

La méthyl-cellulose ne nous donnant pas entièrement satisfaction quant à l'utilisation pratique de la méthode des plages, nous avons cherché un autre milieu solide d'utilisation simple et peu coûteux. L'amidon utilisé par DE MAEYER et SCHONE a été étudié comparativement à la gélose, à la méthyl-cellulose et à l'agarose.

Nous avons préparé le milieu selon la technique de DE MAEYER au détail près que le milieu nutritif est identique à celui utilisé tout au long de ces expériences.

On délaye 10 g d'amidon dans 20 ml d'eau froide à l'aide d'un agitateur magnétique. On ajoute 54 ml d'eau bouillante. La suspension obtenue est amenée à l'ébullition pendant quelquès minutes, jusqu'à ce que le milieu soit limpide et homogène. Puis on refroidit vers + 45°C. On ajoute 20 ml de milieu 5 fois concentré, 5 ml de sérum de veau et 1 ml de vitamines. La solution est vigoureudement agitée pour parfaire le mélange. L'usage de l'agitateur magnétique améliore l'homogénéité.

Tableau XX

	NOMBRE DE PLAGES (Moyenne)	
Dilution virale	Gélose	Amidon
$1/2.10^{-7}$	136	163
2.10^{-7}	65	99
10^{-7}	33	50

Tableau XXI

	NOMBRE DE PLAGES (Moyenne)		
Dilution virale	Gélose	Amidon	Méthyl-cellulose
10^{-7}	26	89	43

Tableau XXII

	NOMBRE DE PLAGES (Moyenne)		
Dilution virale	Gélose	Amidon	Méthyl-cellulose
$1/2.10^{-7}$	14	23	25
10^{-7}	35	54	44
2.10^{-7}	67	84	94

Tableau XXIII

La dose de virus inoculée est ici la même pour tous les essais : $1/2.10^{-7}$.

COUCHE SOLIDE	NOMBRE DE PLAGES OBTENUES	Moyenne
Amidon	82-81-70-70-83	77
Méthyl-cellulose + gélose	70-71-78	73
Gélose	53-55-67-64	59
Agarose	60-63-69-57	62

Il est des cas où les différents milieux solides que nous avons cités sont incapables de mettre en évidence des plages visibles. Dans ce cas précis du virus VISNA, HARTER et CHOPPIN (98) ont eu l'idée d'utiliser une seconde culture cellulaire comme indicateur du pouvoir cytopathogène du virus VISNA sur les cellules de plexus choroïde de mouton. Les cellules infectées réagissent avec les cellules saines de rein de bébé hamster, forment un syncitium qui, en dégénérant, donne naissance à une plage.

Cette technique délicate peut se résumer ainsi : les cellules de plexus choroïde de mouton sont inoculées puis recouvertes de gel de méthyl-cellulose que l'on aspire environ dix jours après ; les cellules de rein de bébé hamster BHK 21 F sont alors ensemencées et dix huit heures plus tard, on coule un milieu gélosé nutritif.

CONCLUSIONS SUR LE MILIEU SOLIDE

Chaque gel semble posséder un inconvénient au moins : la gélose semble inhiber la formation des plages quantitativement pour les virus que nous avons étudiés, qualitativement pour d'autres virus.

La méthyl-cellulose demande un plus grand nombre de manipulations puisqu'il faut couler une couche de gélose supplémentaire le lendemain de l'essai. Ces deux gels ont l'avantage de pouvoir être préparés et stérilisés d'avance

L'amidon ne semble pas posséder de facteur inhibiteur mais sa préparation est obligatoirement extemporanée, ce qui représente une grande perte de temps.

L'agarose présente de multiples avantages mais son coût ne permet pas de l'utiliser dans des essais de routine.

Pour des essais de routine nous avons finalement retenu la gélose "Bacto" de DIFCO, dont le facteur inhibiteur semble être très peu actif. D'autre part, sa préparation en est aisée, sa conservation excellente, sa simplicité et sa rapidité d'emploi sont remarquables et sa tenue à l'étuve parfaite. Pour tous ces avantages résumés et comparés dans le tableau ci-joint, nous préférons utiliser la gélose aux autres gels, même si la réponse fournie n'est pas la plus exacte objectivement, c'est à dire même si chaque particule virale ne donne pas naissance à une plage, puisque les essais sont reproductibles. En effet, le plus souvent cette technique est employée en vue d'obtenir des résultats comparés (phénomènes d'interférences, essais de substances antivirales, etc ...). Utilisée comme moyen de titrer une suspension virale, elle donne des résultats comparables aux autres techniques (103, 104, 105, 173) : inoculation à l'oeuf, au souriceau, titrage en milieu liquide, etc ..., sans être plus qu'une autre mathématiquement exacte. Nous ne sommes pas certain d'ailleurs que les résultats supérieurs donnés par l'amidon ou la méthyl-cellulose soient plus proches de la vérité.

PLAGES SOUS GELOSE

PLAGES SOUS AGAROSE

PLAGES SOUS METHYL-CELLULOSE

PLAGES SOUS AMIDON

CHAPITRE VII

OBTENTION DES PLAGES

-Mise en évidence des plages par un colorant

-Amélioration du contraste

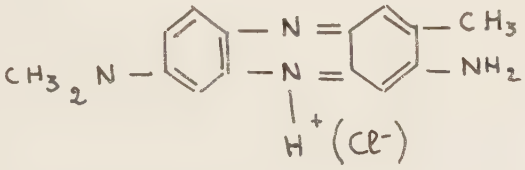
-Température de formation

-Temps d'incubation.

COLORANTS FACILITANT LA LECTURE

Pour faciliter la mise en évidence des plages il est souvent nécessaire, surtout si les plages sont petites, de provoquer un contraste net entre les cellules lysées et les cellules vivantes. Généralement, on utilise le T. T. C. (Chlorure de Triphényl Tétrazolium), indicateur d'oxydoréduction ou le Rouge neutre, indicateur de pH.

Pour notre part, nous avons retenu le Rouge neutre qui colore en rouge les cellules vivantes et en jaune les cellules mortes. Le Rouge neutre est en effet une amino-azine qui est rouge en milieu acide faible et jaune à un pH légèrement supérieur à 7. En présence d'un acide fort, il devient bleu. L'eau distillée, la cellule vivante sont suffisamment acides pour donner une coloration rouge (47).



C'est un faible colorant nucléaire, utilisé pour l'observation des tissus embryonnaires, souvent associé au Vert Janus B (75).

Au microscope, les cellules d'Embryon de Poulet vivantes colorées par le Rouge neutre, montrent un noyau plus foncé que le cytoplasme. Lorsqu'elles sont mortes, le colorant semble plus uniformément réparti, le noyau n'apparaît plus nettement différencié.

La coloration dûe au Rouge neutre est renforcée dans notre milieu par la présence de P. S. P (Phényl-Sulfone-Phtaléine) qui est elle aussi rouge-orangé en milieu faiblement acide.

La toxicité de ce colorant pour les cellules vivantes est dûe à des impuretés difficiles à éliminer lorsque le colorant est préparé sous forme de chlorure, cas le plus fréquent. PHILLIPS et COHEN (165) ont proposé une préparation d'iodure dont les impuretés s'éliminent facilement.

On utilise pourtant toujours le chlorure, mais les procédés actuels de purification permettent l'obtention d'un produit atoxique dont les différents lots sont essayés et certifiés sans toxicité avant la mise en vente.

Certains auteurs toutefois préfèrent ne pas mettre directement le Rouge neutre dans la couche de gélose immédiatement après l'incubation des virus (32, 258). Ils coulent alors une seconde couche de milieu gélosé quelques jours après la première, cette seconde couche contenant le Rouge neutre. D'autres auteurs, comme WALLIS et MELNICH signalent que la solution de Rouge neutre doit être filtrée sur bougie SELAS 3 plutôt que stérilisée à l'autoclave pour diminuer sa toxicité sur les cellules. COOPER préfère mettre la solution de Rouge neutre en contact avec les cellules une ou deux heures seulement avant la lecture.

Concentration du Rouge neutre :

La quantité de Rouge neutre ajoutée au milieu gélosé doit être telle que le contraste entre cellules mortes et vivantes soit assez net mais suffisamment faible pour ne pas manifester de toxicité vis-à-vis des cellules cultivées. Les concentrations généralement utilisées vont de 4/10.000 (32) à 1/42.500 (258) en passant par 1/10.000 (117), 1/11.250 (203), 1/20.000 (48) et 1/40.000 (70).

Pour notre part nous avons essayé d'introduire le maximum de colorant possible dans la couche gélosée de façon à faciliter la lecture autant qu'il se peut.

A 1/7.500, le Rouge neutre cristallise dans la préparation. Entre 1/10.000 et 1/15.000, nous avons obtenu d'excellents résultats.

Au-delà de 1/20.000, le contraste nous a paru insuffisant.

Nous avons donc retenu pour nos essais la concentration de Rouge neutre à 1/10.000 dans la gélose.

Pour augmenter encore le contraste entre zones de lyse et zones de culture vivante, on peut placer au réfrigérateur flacons ou boîtes de PETRI une à deux heures avant la lecture.

On observe ainsi un liseré rouge plus foncé entourant la plage jaune très pâle. Ceci est particulièrement intéressant pour la numération des très petites plages, par exemple celles produites par le virus de la maladie de NEWCASTLE.

AMELIORATION DU CONTRASTE

Nombreux sont les auteurs qui s'accordent pour conseiller l'addition d'ions Magnésium afin de faciliter la mise en évidence des plages.

CHLORURES :

BROWN et OFFICER (24) versent tout simplement une solution concentrée de 2 à 5 % de Chlorure de Magnésium et la laissent en contact une demi-heure. Cette opération renforce l'intensité du Rouge. Les mêmes auteurs prétendent avoir ainsi conservé leurs plages "des mois".

Nous n'avons pu obtenir les mêmes résultats mais il est vrai que les techniques de bases étaient fort dissemblables puisque ces auteurs utilisent des cellules suspendues dans la gélose et non une couche unicellulaire. Pour notre part, nous n'avons observé aucune amélioration quant à la conservation des plages avec le virus SINDBIS ou avec le virus de la maladie de NEWCASTLE.

D'autres auteurs (245, 246, 247, 248) utilisent ce même Chlorure de Magnésium mais cette fois en le mêlant au milieu gélosé. Avec les entérovirus COXSACKIE et ECHO et les réovirus, ils obtiennent à la fois une augmentation de taille et de nombre de plages (246, 247) et dans une autre publication (245) ils démontrent que la précocité d'apparition des plages est d'autant plus grande que la concentration en chlorure de magnésium est plus forte. Toutefois au-dessus d'une concentration de 25 millimoles il y aurait au contraire une inhibition des plages.

WALLIS et MELNICK reconnaissent qu'avec d'autres virus que ceux précédemment nommés, il peut n'y avoir aucun avantage à l'addition de Chlorure de Magnésium, et parfois même au contraire, une inhibition de phénomène. Nous n'avons constaté aucune amélioration mais aucune inhibition avec le virus SINDBIS.

SULFATE :

Un autre groupe d'auteurs (252) a étudié l'effet de l'addition de Sulfate de Magnésium hypertonique. Suivant les cas, ils obtiennent des résultats supérieurs avec des concentrations atteignant 300 à 1000 µg/ml.

Le sulfate de Magnésium est souvent ajouté à la suspension virale elle-même (152).

CALCIUM, HISTONES :

Enfin ROUHANDEH (195) à l'aide de quelques entérovirus a comparé l'effet de l'addition de solutions hypertoniques, d'histones ou de phosphate monocalcique sur des cultures cellulaires différentes. Il parvient ainsi aux résultats suivants :

-Avec une culture de rein de Singe, l'addition de solutions hypertoniquesdonne des résultats supérieurs à celle des histones ou du phosphate monocalcique.

-Avec une culture de cellules Hela, l'addition de solutions hypertoniques ou d'histones donne des résultats supérieurs à celle de phosphate monocalcique.

WALLIS et MELNICK (246) n'ont observé quant à eux aucune différence d'action du Chlorure de Magnésium sur différentes cultures cellulaires, rein de Singe, babouin, grivet et lignée stable KB.

Ces derniers faits montrent bien que lorsqu'il s'agit d'une technique aussi complexe que l'obtention de plages, tous les stades ont un rôle aussi important depuis la nature de la culture cellulaire jusqu'à l'addition d'ions minéraux en passant par les produits enrichissant le milieu en protéines, vitamines, etc... sans oublier la nature du virus.

La combinaison de ces multiples exigences peut d'ailleurs conduire à des techniques encore plus délicates comme nous l'avons vu à propos du milieu solide nécéssaire au virus VISNA, milieu composé d'une seconde culture cellulaire (98)

TEMPERATURE

La température de formation des plages a été étudié au détail par GOMEZ et ISAAC (86) et par BROWN (25) sur des groupes variés de virus : BEDSON et DUMBEL (13) sur le groupe des pox-virus ; LWOFF et LWOFF (146) se sont attachés à déterminer la thermosensibilité du développement viral.

Pour le virus de la maladie de NEWCASTLE, nous avons obtenu irrégulièrement des plages à la température de + 37°C $\pm$ 0,5°C. La température de + 42°C recommandée par GOMEZ et ISAAC nous a donné des résultats plus

reproductibles mais les incidents dûs à la liquéfaction de la gélose étaient si fréquents que nous avons dû abandonner ce virus pour mener à bien notre travail.

Pour le virus SINDBIS, nous avons toujours opéré avec une étuve à + 37°C ± 0,5°C, à la fois pour la fixation des virus et pour la formation des plages.

BROWN pose une question qui nous a semblé intéressante mais à laquelle nous ne pouvons répondre, les différents systèmes de culture cellulaire dépassant le cadre de notre travail.

BROWN se demande en effet si les températures optimales de formation de plages qu'il attribue à différents mutants de virus d'Encéphalite Equine du Vénézuela comme faisant partie de leur patrimoine génétique, seraient les mêmes ou tout au moins dans le même ordre s'il s'était adressé à un autre système que les cellules d'embryons de Poulet, car le plus souvent, la température limite de formation de plages correspond à la température limite de survie des cellules. Ceci rejoint les résultats de GOMEZ et ISAAC à propos du virus de la maladie de NEWCASTLE qui produit un nombre maximal de plages à + 42°C, température sublétale pour les cellules d'embryons de Poulet, mais ne correspond pas au maximum observé à + 37°C pour le virus de la fièvre jaune par exemple, cultivé lui aussi sur embryons de Poulet : à + 39°C, ce virus n'est plus capable de produire de plages

Il est certain malgré tout que si la température idéale de formation de plages dépend avant tout de la nature du virus, la nature de la culture cellulaire doit avoir une influence importante de même que les facteurs présents dans le milieu, à un moindre degré sans doute.

TEMPS D'INCUBATION

Les plages sont distinctes à partir de vingt quatre heures : elles sont alors extrêmement petites, de la taille d'une pointe d'épingle, donc difficiles à compter. Après quarante huit heures, elles ont atteint leur taille normale et il ne s'en formera plus les jours suivants, tout au moins avec les virus que nous avons utilisés (Virus de la maladie NEWCASTLE et SINDBIS).

En laissant les cultures à l'étuve au-delà de trois ou quatre jours, les contours des plages perdent leur netteté, elles ont tendance à se recouvrir les unes les autres puis on assiste à une dégénérescence de la culture cellulaire. Ce phénomène est particulièrement sensible dans les cultures faites en milieu bicarbonaté sous CO_2 ou à l'acide oxalacétique sous CO_2. Le milieu au Tris semble protéger les cellules de cette dégénérescence, sans doute grâce à son pouvoir tampon considérablement supérieur à celui du bicarbonate ou de l'acide oxalacétique. PORTERFIELD (174) a déjà souligné ce phénomène.

Après avoir sorti les cultures de l'étuve, les plages restent encore visibles, environ une semaine puis la dégénérescence décrite plus haut se manifeste, le milieu vire entièrement au jaune, ce qui signe la mort des cellules. C'est encore une fois avec lemilieu au Tris que nous avons pu conserver le plus longtemps (dix à quinze jours) des plages parfaitement visibles et bien rondes. Nos essais de conservation ont été décrits plus haut à propos du colorant facilitant la lecture et nous n'y reviendrons pas.

CHAPITRE VIII

LECTURE DES RESULTATS

De nombreux auteurs conseillent de procéder à la lecture des plages en lumière rasante (24, 32). Les plages apparaissent alors en gris-bleuâtre sur fond coloré. Ce moyen de lecture est intéressant lorsqu'il s'agit de plages petites de 1 à 2 mm de diamètre par exemple.

D'autres auteurs ont proposé la lecture sous microscope, sans coloration, la coloration n'apportant pas d'amélioration dans ce mode de lecture. Ce procédé nous a paru long et fastidieux, même s'il s'agit de plages très petites. Il nous a semblé plus pratique d'utiliser une loupe sous laquelle on peut pointer les plages au fur et à mesure de la numération.

La loupe que nous avons employée est orientable grâce à un bras mobile monté sur un plateau comportant un dispositif d'éclairage sous une plaque de verre dépoli. On peut éclairer la préparation soit par en dessous par la plaque de verre dépoli, soit par le dessus par un dispositif placé dans le cadre de la loupe, soit par les deux procédés à la fois.

Cet appareil nous a également facilité la prise des photographies de plages comme nous le verrons plus loin.

Mais lorsqu'il s'agit de plages du type fourni par le virus SINDBIS, atteignant parfois jusqu'à 6mm, ce procédé est inutile, il suffit de poser le flacon ou la boîte sur une feuille de papier blanc pour voir très facilement et très nettement les plages se détacher en blanc jaunâtre sur un fond rouge homogène.

Chaque plage est alors marquée au crayon à feutre afin d'en faciliter la numération.

Le travail de numération est largement simplifié grâce au Visionneur-Compteur PARIS-LABO* qui enregistre automatiquement chaque point marqué par le stylet encreur. Il n'y a plus possibilité de faire d'erreurs en cas d'interruption ou de dérangement quelconque. L'opérateur peut compter un grand nombre d'essais sans fatigue oculaire excessive. Cet appareil comporte un miroir éclairé sur lequel on place le flacon ou la boîte. Il suffit d'appuyer le stylet encreur sur toutes les plages pour qu'elles soient comptées et enregistrées. On peut s'aider à volonté d'une loupe amovible.

*PARIS-LABO, 7, Rue du Cardinal Lemoine, PARIS 5è.

Nous avons déjà insisté sur le nombre de plages souhaitable dans un essai : il faut en effet qu'il soit compris entre 20 et 100. Au dessous de 20, les différences importantes ne peuvent être significatives. Au dessus de 100, les plages ont tendance à se recouvrir les unes les autres et empêchent ainsi la lecture. Mais de toute façon, il y a toujours un certain nombre de plages qui se chevauchent et pour un travail rigoureux, il serait bon d'estimer le nombre de plages le plus exact possible en fonction de ce chevauchement. LORENZ (143) propose une formule qui permet de ne pas sous-estimer le nombre de plages superposées.

Cette formule tient compte du nombre (n) et du diamètre (d) des plages, le dernier facteur intervenant étant fonction de la dimension du récipient dans lequel est fait l'essai (c). Finalement le nombre de plages total est : $y \quad c\, n^2\, d^2$

WILLIAMS (256), d'autre part, propose des abaques permettant de calculer de façon assez simple le nombre théorique de plages.

PHOTOGRAPHIES

Les photographies que nous avons réalisées ont été prises avec un appareil ALPA à visée perpendiculaire à l'objet à photographier. Le dispositif en est le suivant :

Le flacon ou la boite est posé sur le verre dépoli éclairé de la loupe décrite plus haut, le verre grossissant étant écarté. Un écran en papier épais découpé à la taille du récipient permet de n'éclairer que l'essai qui paraît ainsi plus contrasté et permet d'obtenir des photographies plus nettes. L'éclairage est complété par deux lampes flood dirigées sur l'objet à photographier. L'appareil est monté sur pied et chargé en Kodachrome II pour lumière artificielle, il a généralement été réglé à la vitesse de 1/10 de seconde, le diaphragme étant ouvert à 8.

Les photographies en noir et blanc ont été faites avec des films Plus X Pan 23 din à la vitesse de 1/50 de seconde entre 8 et 11 d'ouverture de diaphragme.

Les photographies microscopiques ont été faites avec le microscope LEITZ ORTHOMAT, microscope muni d'un appareil photographique et d'une cellule réglant automatiquement le temps de pose et l'ouverture du diaphragme,

une fois que l'on a choisi l'importance de l'objet par rapport au champ total. Les films utilisés pour ces photomicrographies sont des SUPER-ANSCO Chrome 400 ASA, ou ANSCOCHROME T 100.

MONTAGE DES PREPARATIONS POUR PHOTOGRAPHIES

L'épaisseur du verre ou de la matière plastique des récipients utilisés pour la culture cellulaire ne permet pas l'observation microscopique à fort grossissement. Pour cela il est nécessaire de monter la préparation sur lame.

STANFIELD et LYMAN (214) proposent un procédé simple pour observer les cultures faites dans des boîtes de PETRI en matière plastique, il suffit, après avoir enlevé la gélose en secouant la boîte légèrement, de colorer la culture au cristal violet et de découper la partie intéressante à l'aide d'une lame chauffée. C'est ce procédé que nous avons utilisé pour observer les plages au microscope et en obtenir des photographies.

Pour observer les préparations cultivées en flacons de verre, la difficulté est plus grande, on ne peut briser le flacon. HOLLAND et MAC LAREN proposent une méthode de coloration de la culture à l'intérieur même du flacon (111). Dès que les plages ont atteint leur taille maximale, le milieu gélosé est retiré des flacons en les retournant en le secouant au moment où ils sortent de l'étuve à + 37°C. Le milieu gélosé glisse facilement en dehors du flacon(il est parfois nécessaire de s'aider d'un courant d'eau chaude sur la paroi extérieure du flacon).

En même temps que la gélose, les cellules mortes ou atteintes sont éliminées. Seules les cellules saines restent fortement fixées au verre. Après avoir lavé la préparation à l'eau distillée, elle est colorée au cristal violet.

Ceci ne permet qu'une observation au faible grossissement. Pour une observation plus fine, il est nécessaire de retirer la couche cellulaire du flacon et de la monter sur lame.

Nous avons utilisé pour cela la technique d'ENDERS (71) qui consiste à étendre sur les cellules une pellicule de collodion ; la culture est d'abord fixée par le formol pendant une heure. Puis on la déshydrate en la recouvrant de petites quantités d'alcool de titres croissants.

On termine par un mélange éther-alcool à parties égales. Puis on remplit le flacon avec une solution diluée de collodion dans l'éther, une heure ou plus, pour permettre la pénétration de collodion dans les cellules.

Le collodion en excès est éliminé et on sèche jusqu'à ce qu'on ne sente plus l'odeur de l'alcool-éther (une à deux minutes). A ce moment, on fait entrer lentement de l'eau froide dans le flacon, la pellicule se détache du verre. Il suffit alors de la tirer du flacon à l'aide d'une pince. La membrane est découpée dans une boîte de PETRI, colorée à l'hématoxyline éosine (l'éosine alcoolique étant plus satisfaisante). On éclaircit par l'alcool à 25 % dans l'huile d'origan puis dans le xylol, mais pas à l'alcool pur, sinon le collodion se dissoudrait dans l'alcool.

Enfin la pellicule est fixée entre lame et lamelle à l'aide de baume du Canada.

CHAPITRE IX

CONCLUSION

Méthode définitivement adoptée

Des oeufs mirés et désinfectés on extrait les embryons dont tête, pattes et viscères sont écartés. Les corps embryonnaires sont ensuite lavés au liquide de HANKS, puis hachés aux ciseaux, lavés à nouveau.
La première trypsination est effectuée à + 37°C sur agitateur magnétique pendant trente minutes à l'aide d'une solution de Trypsine DIFCO à 1/250 à 1 °/₀₀ préparée et filtrée une semaine auparavant, conservée au frigidaire.
La trypsine est tout d'abord réchauffée à + 37°C puis versée sur les embryons à raison de 5 ml environ par embryon. Au bout de trente minutes le liquide contenant les cellules libérées est décanté immédiatement dans un bac à glace. Une nouvelle quantité de Trypsine est ajoutée aux débris embryonnaires restant et la digestion se poursuit sur agitateur magnétique à la température du laboratoire pendant deux heures.

Les deux liquides de digestion décantés sont alors réunis et filtrés deux fois stérilement sur douze épaisseurs de gaze. Le filtrat est réparti dans des pots à centrifuger à bouchon à vis et centrifugé cinq minutes à 1 000 tours/minute pour éliminer la Trypsine.

Le culot est lavé trois fois de suite avec du liquide de HANKS, le liquide de lavage étant éliminé par centrifugation et décantation.

Puis les cellules sont remises en suspension dans un milieu à l'hydrolysat de caséine neutralisé par du Tris et additionné de 10 % de sérum de veau à raison de 1 ml de milieu par embryon. Ce milieu à l'hydrolysat de caséine est préparé de la façon suivante :

Dans un flacon stérile de 500 Ml on verse le contenu d'une ampoule de milieu concentré à l'hydrolysat de caséine fourni par l'Institut Pasteur. On ajoute les trois quarts de la quantité d'eau bidistillée stérile nécessaire puis 5 ml de la solution mère de Tris préparée comme il a été dit précédemment et 1,5 ml de solution de Rouge de Phénol à 0,1 %. Le pH est

alors ajusté soit à la soude soit à l'acide chlorhydrique de façon à obtenir un milieu de teinte rouge-orangé. Enfin le volume est complété à 500 ml après addition des antibiotiques à la dose usuelle.

Ce milieu peut être conservé au frigidaire quelques jours à condition d'être fermé au bouchon de caoutchouc.

La suspension cellulaire obtenue doit alors être homogénéisée par aspiration et rejet à l'aide d'une pipette stérile de façon à pouvoir procéder à la numération des cellules.

La numération est réalisée comme il a été dit plus haut, c'est-à-dire après dilution au 1/20 dans un mélangeur de POTAIN. Une goutte de dilution homogène est placée dans une cellule de MALASSEZ. Après la numération, la suspension est diluée de façon à obtenir deux millions de cellules par ml, dans du milieu à 10 % de sérum de veau.

La suspension ainsi obtenue est répartie dans des boîtes de PETRI stériles en matière plastique de 5 cm de diamètre à raison de 5 ml par boîte. Puis les boîtes sont placées à l'étuve à + 37°C à atmosphère enrichie de 5 % de gaz carbonique pendant dix huit heures.

OBTENTION DES PLAGES

Après ce temps d'incubation, les boîtes sont triées de façon à ne garder que les cultures parfaites seules capables de donner des résultats valables. Ces cultures sont lavées deux fois avec du liquide de HANKS neutralisé au Tris et recouvertes de la dose de virus choisie, de telle sorte que sous un volume de 1 ml il y ait entre 20 et 100 particules virales donnant naissance à des plages.

La dilution de virus est réalisée dans du tampon-tampon-sérum. 1 ml de la dilution choisie est réparti de façon homogène sur la culture qui est ensuite replacée à l'étuve à gaz carbonique pendant une heure.

Au bout de ce temps et sans éliminer l'inoculum viral, le milieu gélosé maintenu à + 40°C est coulé sur la culture.

Le milieu gélosé est composé :

- D'une part de gélose à 30 °/$_{oo}$ dans l'eau distillée contenant 2 pour 10.000 de Rouge neutre.

- D'autre part d'un milieu nutritif contenant :

-Milieu de PARKER double neutralisé au Tris : 1 partie,

-milieu de HANKS double neutralisé au Tris : 1 partie,

-sérum de veau 10 %

-solution de vitamines 2 %

Immédiatement avant de couler le milieu sur les cultures, on mélange les deux milieux maintenus à + 40°C de la façon suivante :

- Gélose	1 partie
- Milieu liquide	1 partie

Le milieu définitif contient donc :

- Gélose à 30 %	2 parties
- Rouge neutre.....	1/10.000
- Milieu de PARKER double	1 partie
- Milieu de HANKS double	1 partie
- Sérum de veau	5 %
- Solution de vitamines	1 %
- Solution mère de Tris	1 %

Ce mélange est coulé sur les cultures à raison de 5 ml par boîte de PETRI.

Le milieu une fois gélifié, les cultures sont replacées à l'étuve à atmosphère enrichie en gaz carbonique pendant quarante huit heures, la face gélosée étant au-dessus.

Le troisième jour les plages sont comptées à l'aide du Visionneur-Compteur.

Cette méthode semble tout à fait fidèle et reproductible.

D'une expérience à l'autre, d'un opérateur à l'autre, les chiffres obtenus pour une même couche de virus ne varient jamais au-delà de la limite de 20 %, limite de sensibilité habituellement admise en biologie, et déjà remarquée dans le cas des plages par HO et BREINIG (110).

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DE NOTRE METHODE A L'ESSAI DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE QUELQUES SUBSTANCES

Nous avons esayé de déterminer l'action antivirale d'un certain nombre de produits appartenant à des séries chimiques différentes.

Nous avons choisi diverses méthodes permettant la mise en valeur d'une activité de la substance , puis nous avons comparé les résultats obtenus , afin d'établir quelque indication sur le mode d'action.

Il faut remarquer dès maintenant que si l'on dispose d'une quantité de méthodes d'analyse pour l'activité d'une substance antivirale , il n'existe pas encore de techniques standardisées comme dans le domaine de l'activité antibactérienne (antibiotique) par exemple.

Un premier effort dans ce sens a été réalisé par le Congrès International de Standardisation de Microbiologie en 1960 (62) , puis par l'Institut d'Hygiène et de Microbiologie de l'Université libre de Berlin qui a présenté une proposition de standardisation des techniques d'essai de propriétés antivirales pour les désinfectants chimiques (Mars 1963) (201) .

Par la suite (1966), GROSSGEBAUER (88), à partir de ces travaux , a tiré quelques notions essentielles qui permettent surtout d'éviter de grosses erreurs d'interprétation des résultats obtenus . En particulier, cet auteur rappelle qu'il convient de contrôler la toxicité éventuelle de la substance sur le matériel vivant utilisé , afin d'éliminer les variations importantes de pH qui agiraient dans le même sens que la toxicité, et enfin de dissocier l'effet virustatique de l'effet virulicide. Nous reviendrons plus loin sur toutes les conditions expérimentales que cela suppose.

PENSO (163), passant en revue les différentes méthodes utilisées à ce jour pour étudier l'Interféron et les substances antivirales, propose de comparer les épreuves d'activité suivantes :

1) P.F.U. : capacité de réduire le titre exprimé en unités formant des plages, du virus sur des fibroblastes d'embryons de Poulet.
Une réduction de 50 % du nombre de plages est considérée comme significative ; "la dose active 50 %" peut être définie graphiquement.

2) Hémagglutination :
Capacité de réduire le titre hémagglutinant du virus.
La réduction statistiquement significative serait de 75 %.

3) C.P.E. ou E.C.P. (Effet Cyto-Pathogène)
Capacité de réduire l'Effet Cyto-Pathogène du virus sur culture de fibroblastes d'embryons de Poulet.
Ici, la dose protégeant 50 % de la culture est considérée comme unité d'activité.

4) Inhibition des plages :
Capacité de protéger la culture de fibroblastes d''embryons de Poulet de l'action destructrice du virus sous gélose.
Cette méthode semble nécessiter des concentrations de substances antivirales 10 à 100 fois supérieures à celles qui sont suffisantes dans les autres méthodes.

Ces différentes méthodes "in vitro" ne concordent pas toujours entre elles d'une part, ou avec les méthodes "in vivo" d'autre part, probablement parce qu'elles ne font pas appel au même processus d'action lors de la mise en évidence de l'effet antiviral.

Pour notre part, nous avons recherché l'activité antivirale d'un certain nombre de substances en utilisant notre méthode de formation de plages, selon les principes exposés par PENSO dans sa première et sa quatrième épreuves.

Puis nous avons comparé les résultats obtenus "in vitro" avec ceux que nous avons obtenu in vivo (in ovo) avec un autre virus, dans d'autres conditions.

CHAPITRE I

TECHNIQUES IN VITRO

GENERALITES

1. Souches virales
   - Sindbis
   - Vaccine
2. Substances antivirales : mise en solution
3. Influence du solvant

I. GENERALITES

Culture : La culture cellulaire utilisée est celle que nous avons décrite dans la première partie de ce travail. C'est une culture unicellulaire de fibroblastes d'embryons de Poulet en boîtes de matière plastique Nunclon de 5 cm de diamètre , la culture étant additionnée de Tris et placée dans une étuve à circulation de gaz carbonique.

Etuve : Dans cette partie de notre travail , nous avons utilisé l'étuve de LWOFF fabriquée par les Etablissements LEQUEUX , avec ses caissons étanches . Les résultats obtenus avec ce matériel sont identiques à ceux précédemment obtenus , mais le montage des circulations de gaz est extrêment simplifié .

Virus : Les propriétés antivirales des différents produits ont été essayées vis à vis de deux virus , l'un à acide ribonucléique (ARN) , le virus Sindbis , l'autre à acide désoxyribonucléique (ADN) , le virus de la Vaccine.

Sindbis : Ce virus est le même que celui qui nous a servi à mettre au point notre technique de plages . Les conditions d'obtention , de conservation et de titrage ont été décrites précédemment .

Vaccine : La souche de virus vaccinal utilisée ici a été obligeamment donnée par l'Institut de la Vaccine* au Laboratoire à l'occasion du travail de MERCIER sur les ADN d'origine virale . Le virus utilisé dans nos essais a été cultivé selon la méthode exposée par MERCIER (153). Nous n'en donnons ici que le résumé .

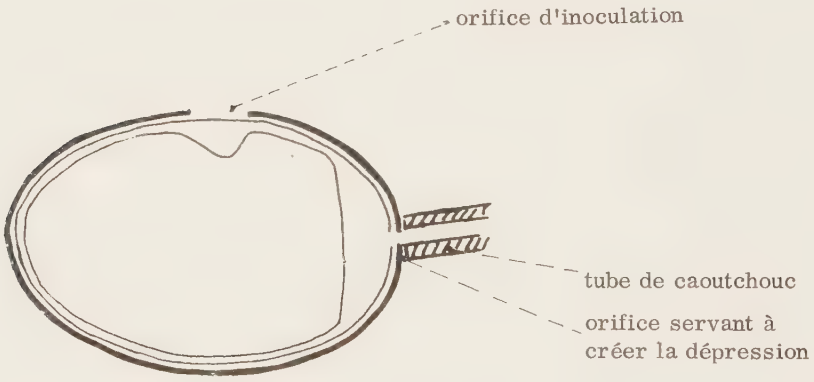
ENTRETIEN DE LA SOUCHE DE VACCINE

La culture du virus vaccinal est réalisée sur la membrane chorio-allantoique de l'oeuf embryonné âgé de 12 jours .

*Institut de la Vaccine , 8 , rue Ballu , Paris 9 è

L'inoculum princeps était la suspension glycérinée de virus délivrée par l'Institut de la vaccine. Cette souche a été passée de nombreuses fois en oeuf embryonné , de façon à obtenir une souche bien adaptée à l'oeuf de Poulet. Nos essais ont été réalisés avec le lot provenant du 5e passage préparé de la façon suivante :

L'inoculum est déposé sur la membrane chorio-allantoique , en évitant le moindre traumatisme. Pour cela, il est nécessaire de décoller la membrane coquillère qui adhère à la coquille , de la membrane chorio-allantoique. Ce décollement est réalisé en créant une dépression entre ces deux membranes.



La coquille désinfectée à l'alcool est usée et décollée de la membrane coquillère sur 3 à 5 mm environ, dans une région dépourvue de gros vaisseaux sanguins, et percée à l'aide d'un foret du côté de la poche à air. A l'aide d'un tube de caoutchouc adapté au trou correspondant avec la poche à air , l'opérateur aspire doucement de façon à créer une légère dépression suffisante pour décoller les deux membranes. La membrane coquillère peut alors être fendue sans risque de traumatisme pour la membrane chorio-allantoique, et l'inoculum (o,1ml de suspension virale capable de provoquer des pustules confluentes) est déposé sur la membrane chorio-allantoique.

L'orifice est rebouché à l'aide d'une lamelle de 22 x 22 mm; maintenue par un anneau de paraffine. Celui de la poche à air est rebouché avec une goutte de paraffine.

Les oeufs sont alors replacés en position horizontale dans la couveuse à + 38,5°C. Ils seront mirés les deux jours suivants. Les oeufs morts au bout de 24 heures seront éliminés.

Après 48 heures d'incubation, les membranes chorio-allantoique des oeufs vivants sont prélevées et découpées dans une fiole de Fourneau contenant quelques millilitres de tampon Tris à pH 9 à 0°C. (0,1 N HCl et 0,1 M Tris) et lavées deux ou trois fois avec ce tampon.

Après une centrifugation de 5 minutes à 2000 tours/ minute, les membranes sont transvasées dans le récipient de l'homogénéiseur avec 2 ml de tampon Tris par membrane et 1 ml d'Arcton 63 (Fréon).

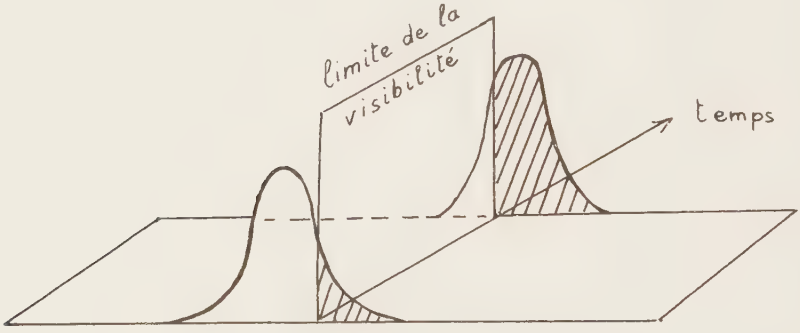
Le tampon Tris est utilisée pour favoriser la dispersion du virus , ce qui ne saurait être obtenu à l'aide d'un tampon salin , et l'addition de Fréon a pour but de purifier la suspension virale des protéines associées.

L'émulsion obtenue est centrifugée 10 minutes à + 4°C dans une centrifugeuse réfrigérée, à 2000 tours/minute. La phase aqueuse supérieure est prélevée et centrifugée à + 4°C à 10.000 tours/mn, afin de faire sédimenter les virus. Ils seront remis en suspension dans 5 ml de tampon Tris, cette dernière opération étant facilitée par un traitement aux ultrasons (40 Kc - 175 w).

Titrage

Le titrage de la suspension de virus vaccinal est réalisé comme dans le cas du virus Sindbis en utilisant notre méthode de formation des plages , au détail près que le temps d'apparition des plages est plus long. Le nombre maximal des plages s'obtient en 4 ou 5 jours.

Au cinquième jour, la taille des plages atteint son maximum, environ 2 mm de diamètre; c'est ce jour que nous avons choisi pour la lecture de nos essais. Il ne se formera plus de plages ensuite, mais le contraste a tendance à diminuer les jours suivants, car les cellules d'embryons de Poulet commencent à dégénérer dans la mesure où la substance nutritive du milieu gélosé s'épuise. En fait, dès le deuxième jour, toutes les plages sont formées, comme l'ont montré LINDENMANN et GIFFORD (138). Mais il s'agit d'infra-plages, c'est à dire que leur diamètre est inférieur à la limite de la visibilité.



Représentation schématique du passage des infra-plages à la visibilité d'après LINDENMANN et GIFFORD .

Le titre de la suspension est calculé d'après le nombre de plages obtenu avec la dernière dilution qui en donne encore.

Cette méthode de titrage donne des résultats voisins de ceux que donne la méthode de numération des pustules sur membranes chorio-allantoique (153).

Conservation

La suspension virale obtenue est alors répartie en ampoules de 1 ml sous un volume de 0,3 ml environ, et conservée à - 20°C. La suspension ainsi préparée semble particulièrement bien dispersée, puisque nous obtenons

des plages réparties de façon uniforme sur toute la surface de la boîte de Pétri.

Le titre de cette suspension est stable, beaucoup plus stable que dans le cas du virus Sindbis par exemple : nous n'avons observé aucune diminution significative en 7 mois de conservation à - 20°C.

DILUTIONS DE VIRUS

A partir de ces deux suspensions virales concentrées, les dilutions sont effectuées dans le Tampon-Tampon-sérum dont la formule a été donnée dans la première partie.

Les suspensions virales sont ainsi amenées au double de la concentration nécessaire pour obtenir entre 50 et 100 unités-plages pour le virus Sindbis, entre 200 et 500 unités-plages pour le virus vaccinal, dans un volume de 1 ml.

2. SUBSTANCE ANTIVIRALE

La substance à étudier est diluée elle aussi dans le Tampon-Tampon-sérum si elle est soluble dans l'eau. La solution doit contenir le double de la dose à essayer.

Lorsque la substance à essayer n'est pas soluble dans l'eau, nous l'avons dissoute dans le D. M. S. O. (Diméthyl-sulfoxyde), puis complété le volume avec le tampon, pour obtenir une solution mère, diluée ensuite dans le Tampon-Tampon-sérum. Dans la solution finalement utilisée, la proportion de Diméthyl-sulfoxyde n'a jamais dépassé la dose de 10 % , le plus souvent d'ailleurs, la concentration de 1 % a été suffisante pour obtenir une solubilité parfaite de la substance.

INFLUENCE DU SOLVANT

Il fallait d'abord s'assurer que ce produit solubilisant n'intervenait pas dans le phénomène de formation des plages. Or il apparait d'après nos essais que le D. M. S. O. possèderait une très légère action antivirale , ou

au contraire favoriserait l'effet cytopathogène, selon le cas.

Le D. M. S. O. mis en contact pendant une heure avec une suspension de virus Sindbis, nous a fourni les résultats suivants :

(Les concentrations données ici sont les concentrations réelles, après mélange avec la suspension virale).

D/M. S. O. dilué à	50 %.....	toxicité cellulaire
	40 %.....	idem
	25 %.....	idem
	15 %.....	50 % de plages par rapport au témoin.
	10 %.....	107 %
	5 %.....	120 %
	1 %.....	89 %
	1/1000	79 %
	1/10. 000	100 %
	etc.....	100 %

Cette substance parait donc possèder trois zones d'action différentes, vis à vis du virus Sindbis.

1) - Aux fortes concentrations, elle est toxique pour la cellule. Au microscope, les cellules apparaissent comme fixées, ne présentant aucune lyse ni aucune dégénérescence, elles semblent absolument parfaites mais mortes.

2) - Aux concentrations moyennes (10 % - 5 %), le nombre des plages obtenu est supérieur à celui des boîtes témoins. Peut-être ce phénomène est-il dû au pouvoir de diffusion du D. M. S. O. qui faciliterait peut-être la pénétration du virus dans la cellule.

On remarque en effet, à ces doses, un nombre de petites plages en proportion importante. Habituellement, il y a environ 30 à 40 % de petites plages; ici, on dénombre plus de 50 % de petites plages.

Par contre, les grosses plages sont plus grandes et à bords moins nets. Les hypothèses expliquant ce phénomène sont variées.

- le D. M. S. O. faciliterait-il le développement des mutants à petites plages? On sait, en effet, qu'à la température de + 37°C, les trois mutants donnant des petites, des grandes (97) et de très grandes plages (225), se développent parallèlement. Le D. M. S. O. pourrait soit favoriser les mutants à petites plages, soit inhiber les mutants formant des grosses plages ou des très grandes plages.

- le D. M. S. O. , en augmentant la capacité de pénétration du virus dans la cellule, permettrait-il de voir à l'oeil nu des plages qui n'apparaitraient pas normalement ? Cette hypothèse est renforcée par le fait que la taille des grandes plages est aussi augmentée , mais il est possible aussi que les très grandes plages soient favorisées.

3) - Aux faibles concentrations (1 % - 1/1000), il semble y avoir un léger pouvoir antiviral qui se traduit par une inhibition de 11 à 21 % du nombre de plages.

A partir de 1/10. 000, on n'observe plus aucune action du produit.

Les résultats obtenus in ovo, comme nous le verrons plus loin sont du même ordre.

Par ailleurs, SCHREK, cultivant des lymphocytes, observe à partir du troisième jour de culture une toxicité se manifestant par la mort des cellules pouvant atteindre une proportion de 30 % au septième jour, avec une dose de 20 % de D. M. S. O. Les cellules malignes seraient encore plus touchées, puisque dans les leucémies, il observe 90 % de lymphocytes morts au septième jour (202).

De même, les cellules L et les cellules HeLa ne prolifèrent plus en présence de 2 à 3 % de D. M. S. O. (40, 41).

La mort plus rapide des cellules se remarque aussi dans la culture de fibroblastes d'embryons de Poulet, mais ce phénomène ne nous gêne pas dans la lecture de nos essais avec le virus Sindbis, puisque cette lecture se pratique toujours le deuxième jour suivant l'incubation. Dans les essais impliquant le virus vaccinal, où la lecture a lieu au cinquième jour, il est possible d'avancer d'un jour (car les plages sont plus grosses) mais jamais de différer le dénombrement des plages (196).

INFLUENCE DU DIMETHYL SULFOXIDE SUR
LE DEVELOPPEMENT DES PLAGES
DU VIRUS SINDBIS

T = 250

Contact					Protection			
m	T-m	$\frac{T-m}{T}$ x 100	$\frac{m}{T}$ x 100	Dose	m	T-m	$\frac{T-m}{T}$ x 100	$\frac{m}{T}$ x 100
Toxique cellulaire				50 %	Toxique cellulaire			
Toxique cellulaire				40 %	Toxique cellulaire			
Toxique cellulaire				25 %	Toxique cellulaire			
10	240	96 %	4 %	20 %	7	243	96 %	4 %
125	125	50 %	50 %	15 %				
265	-15	-	107 %	10 %	162	88	35 %	65 %
312	-62	-	125 %	5 %	-	-	-	-
230	20	8 %	92 %	1 %	204	46	18,5 %	81,5 %
203	47	19 %	81 %	1 °/₀₀	192	50	23,5 %	76,5 %
245	5	2 %	98 %	1/10.000	180	70	28 %	72 %
250	0	0 %	100 %	1/100.000	203	47	18,5 %	81,5 %

La remontée de la courbe aux environs de 1 % nous ayant intriguée, un nouvel essai dans cette zone de concentration nous a donné les résultats suivants :

m	T-m	$\frac{T-m}{T}$ x 100	$\frac{m}{T}$ x 100	Dose
125	- 11	-	120 %	5 %
91	+ 13	11 %	88 %	1 %
81	23	21 %	79 %	1 °/₀₀
105	0	0 %	100 %	1/10.000

VIRUS VACCINAL

Avec ce virus, l'activité du D. M. S. O. se présente différemment on ne remarque qu'une seule zone, qui est nettement antivirale.

Contact			Dose	Protection		
m	T - m	$\frac{T - m}{T} \times 100$		m	T - m	$\frac{T-m}{T} \times 100$
0	439	100 %	20 %	0	439	100 %
15	424	97 %	10 %	172	267	60 %
250	189	43 %	1 %	333	106	24 %
360	79	18 %	1/1000	306	133	30 %
281	158	36 %	1/10.000	290	149	34 %
386	53	12 %	1/100.000	290	149	34 %

Témoin : 439 plages

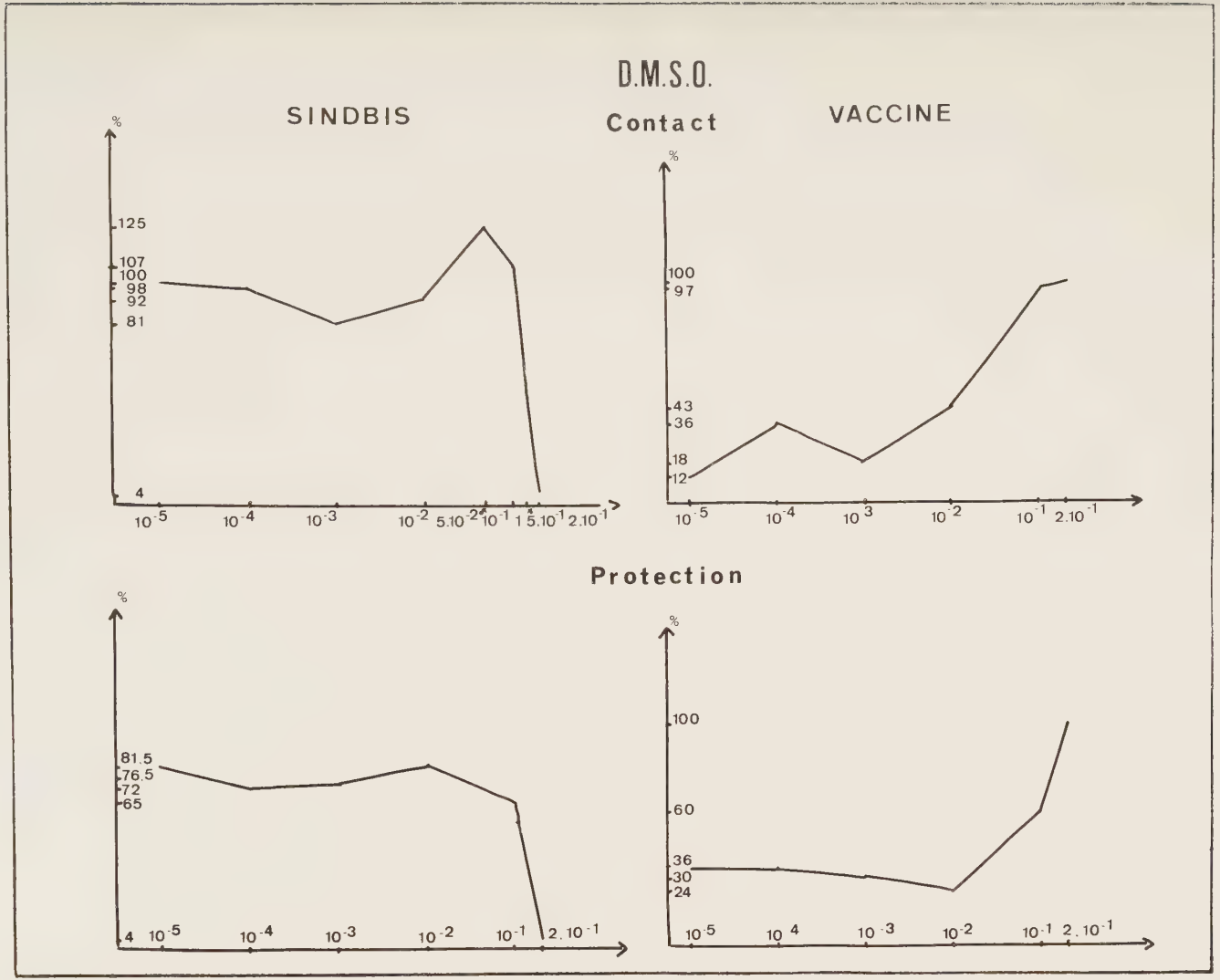
Ces résultats montrent qu'il est impossible de ne pas tenir compte de la présence du D. M. S. O. dans un essai impliquant le virus Sindbis et le virus vaccinal. Nous avons donc réalisé, chaque fois que le D. M. S. O. était utilisé comme solvant, un témoin contenant la même quantité de virus et la même quantité de solvant que l'essai

Ces résultats sont, au moins partiellement , en accord avec ceux deCHANG (40 , 41). Cet auteur a mis en évidence une augmentation de la multiplication des plages aux environs de 8 % ; ceci pourrait être dû à l' exaltation de l'activité enzymatique de nombreux systèmes : ainsi, l'activité de la RNase est maximale pour une concentration de 12 % du D. M. S. O. , l'activité de la galactosidase augmente de 20 % en présence de 24 % de DMSO.

Avec le Mengo virus, CHANG obtient des résultats comparables à ceux du virus Sindbis, puisqu'il montre une augmentation de la multiplication virale de 0, 65 à 12 % avec une concentration de 12 % de D. M. S. O.

Par ailleurs, nous retrouvons comme CUMMINGS et coll. (49), la toxicité aussi bien pour le virus que pour le système cellulaire hôte aux fortes concentrations : avec 67 à 80 % de D. M. S. O. dans l'eau, CUMMINGS montre que le bactériophage λ et T-even sont scindés en deux parties tandis que les autres bactériophages T 2 L , T4 BO 1 et T 6 sont détruits. Ceci pourrait bien être dû à l'altération des protéines par le D. M. S. O. en milieu aqueux. En effet, ce solvant dipolaire sans proton diffère des solvants polaires donneurs de protons dans le fait qu'il a tendance à en accepter (148 , 185).

L'activité antivirale du D. M. S. O. pourrait s'expliquer, comme l'ont décrit KATZ et PENMAN par la dénaturation des hélices d'A. D. N. et d'A. R. N. chez les cellules HeLa et le Poliovirus (118). Mais il est certain aussi que l'activité variable de ce solvant sur des enzymes voisins est responsable d'un certain nombre de phénomènes curieux (185). Est-ce en favorisant certains enzymes - les perméases par exemple - que le D. M. S. O. favorise la pénétration intracellulaire de différents colorants (40), médicaments (mannitol, urée, sodium, potassium, chlorures, stéroides) et même des virus (6) ?


D.M.S.O.
SINDBIS
Contact
VACCINE
%
125
107
100
98
92
81
4
10-5
10-4
10-3
10-2
5.10-2
10-1
1
5.10-1
2.10-1
%
100
97
43
36
18
12
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
2.10-1
Protection
%
81.5
76.5
72
65
4
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
2.10-1
%
100
60
36
30
24
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
2.10-1

CHAPITRE II

IN VITRO

1 - ACTIVITE VIRULICIDE

ESSAIS DE CONTACT

2 - ACTIVITE VIRUSTATIQUE

ESSAIS DE PROTECTION

3 - REMARQUES

Nous avons cherché à définir l'activité virustatique et l'activité virulicide d'une substance en utilisant notre technique de formation des plages.

Avec PENSO (163), nous avons adopté pour ces deux activités les définitions suivantes :

Activité virustatique

Dose inhibant la multiplication des virus ; elle est déterminée en inoculant à la culture de tissu la dose maximale de substance qui ne soit pas toxique pour le matériel vivant et en évaluant sa capacité d'inhiber le développement du virus introduit par la suite.

Activité virulicide

Dose détruisant le virus : elle est déterminée en inoculant le virus préalablement soumis à l'action de la dose maximale atoxique pour le matériel vivant choisi pendant une heure à la température du laboratoire ou 30 minutes à + 37°C.

Pour chacun des produits essayés, nous avons déterminé chaque fois que cela était possible, la dose virustatique 100 % , 50 % , 0 % , et la dose virulicide 100 % , 50 % , et 0 % et procédé à ce qu'on pourrait appeler un antivirogramme.

I. CONTACT OU ACTIVITE VIRULICIDE

La mise en contact de la suspension virale et de la substance se fait par mélange à parties égales. Le temps de contact adopté dans tous nos essais est de une heure à la température du laboratoire.

Pendant le même temps, la suspension virale à concentration double est mélangée avec autant de Tampon-Tampon sérum, de façon à obtenir un témoin de suspension virale qui ait séjourné aussi une heure à la température du laboratoire, dans les mêmes conditions que les essais. De cette façon, on élimine les erreurs qui pourraient être dûes à la diminution spontanée du titre du virus abandonné une heure, et d'autre part l'effet des variations de température d'une expérience à l'autre.

Après une heure de contact, les boîtes de cultures cellulaires ayant été soigneusement rincées au liquide de HANKS deux fois de suite sont inoculées avec 1 ml du mélange. Trois boîtes sont réservées au témoin de suspension virale.

L'adsorption du virus restant est réalisée selon la technique habituelle : une heure à + 37°C , sous un courant de gaz carbonique.

Au bout de ce temps, et sans éliminer le liquide contenant virus et substance, le milieu gélosé habituel est coulé dans les boîtes. Après gélification, les cultures sont placées 48 H à l'étuve à + 37°C avec circulation de gaz carbonique, lorsqu'elles ont été inoculées avec le virus Sindbis.

Pour le virus vaccinal, nous avons choisi la température de + 35°C recommandée par GOMEZ et ISAACS (86), qui semble la plus favorable au développement des plages. Le temps nécessaire à leur apparition est beaucoup plus long que pour le virus Sindbis : il faut environ cinq jours de séjour à l'étuve pour obtenir le nombre maximal de plages.

La numération des plages est donc faite le jour correspondant au maximum de plages pour chacun des virus. A partir de ces résultats, nous avons calculé, par comparaison aux boîtes témoins, l'effet de chaque dose de substance. La moyenne du nombre de plages obtenu pour une même dose (calculée sur un lot comportant au moins trois boîtes) est soustraite du nombre de plages témoin pour obtenir l'effet pour cent.

Exemple : Dichloro 2-6 parabenzoquinone sur le virus vaccinal

Témoins : 200 - 205 - 195 plages. Moyenne - 200

concentration réelle / ml de D. C. P. B. Q.	Nombre de plages obtenu	Moyenne	T - M	Effet % $\frac{T-M}{T} \times 100$
10 µg	Toxique cellulaire			
5 µg	33-41-31	35	165	$\frac{165}{200} \times 100 = 83\%$
2,5 µg	84-92-85	87	113	57 %
0,5 µg	155-137-120	137	63	31 %

Les résultats obtenus sont portés sur un graphique et permettent le tracé d'une courbe exprimant l'action antivirale en fonction des concentrations (abscisses : concentrations ; ordonnées : % d'effet).

Sur cette courbe nous avons repéré, chaque fois que cela était possible, l'effet 0 % , l'effet 50 % , l'effet 100 %. Ces chiffres sont portés sur un tableau général comparant les différentes méthodes utilisées.

L'effet 50 % représente la dose sur laquelle on peut établir des comparaisons. En effet, il est parfois difficile de déterminer la dose donnant 100 % d'inhibition, soit parce que le produit est toxique pour le système employé au-delà d'une certaine concentration, soit parce que l'effet 100 % ne peut être obtenu, quelle que soit la dose utilisée pour un produit atoxique.

L'exemple que nous venons de citer représente le cas le plus facile à mettre en évidence : on observe une inhibition de la formation des plages et la réduction du nombre de plages par rapport au témoin peut se chiffrer.

Mais plusieurs fois, nous avons reconnu à des substances diverses une certaine activité antivirale, qui se traduisait non pas par une réduction du nombre de plages, mais par une réduction très nette de leur taille, accompagnée ou non d'une légère diminution du nombre.

II PROTECTION OU ACTIVITE VIRUSTATIQUE

Les conditions de culture cellulaire sont identiques à celles employées dans la détermination de l'activité virustatique.

L'activité virustatique a été étudiée là encore vis à vis du virus Sindbis et du virus vaccinal.

La substance est d'abord diluée de façon à obtenir la concentration souhaitée dans le Tampon-Tampon sérum. Lorsque cela est nécessaire elle est d'abord solubilisée dans le Diméthyl-sulfoxyde, puis diluée dans le Tampon-Tampon sérum.

Chaque boite de culture, une fois lavée, reçoit 1 ml de la dilution choisie de substance. En général, nous avons utilisé quatre doses en progression géomètrique de raison 2 ou 10 selon que nous connaissions ou non à priori l'ordre de grandeur de la dose active d'après d'autres types d'essais.

Puis les cultures sont portées à l'étuve à + 37°C pendant 1 heure.

Au bout de ce temps, la suspension virale est inoculée sous un volume de 1 ml, de façon à obtenir entre 50 et 100 plages dans les boites témoins qui ont reçu pendant une heure 1 ml de Tampon-Tampon sérum avant l'inoculation du virus.

Après une adsorption d'une heure à l'étuve à + 37°C, les boites de culture reçoivent le milieu gélosé habituel, puis sont replacées à la température convenable (+ 37°C pour le virus Sindbis, + 35°C pour le virus vaccinal).

La lecture de l'essai se fait 48 heures après cette inoculation pour le virus Sindbis, 5 jours plus tard pour le virus vaccinal. Pour cela, on compte les plages obtenues avec chaque dose, et la moyenne calculée est déduite de la moyenne des témoins, pour obtenir là encore l'effet pour cent.

Les résultats sont portés sur un graphique représentant l'effet pour cent (en ordonnées) en fonction de la concentration (en abscisses).

De ce graphique, nous avons extrapolé les doses donnant 0 %, 50 %, et 100 % d'effet virustatique. Ce sont elles qui figurent dans notre tableau général.

III. QUELQUES REMARQUES SUR CES METHODES

1. ASPECT DE LA COURBE

Les substances très toxiques (du type quinones par exemple) donnent une courbe assimilable à une droite. La zone d'activité est très étroite, très proche de la zone de toxicité.

Comme la plupart des auteurs (139), nous avons, pour les autres substances, une courbe du type sigmoïde, les deux asymptotes n'étant pas obligatoirement situées au niveau du 0 ou du 100 %. En effet, il arrive que l'activité maximale soit asymptote du 90 % (activité virulicide de FC 243 par exemple) ou même de 60 % (activité virustatique de FC 47 et de l'A. B. O. B. par exemple).

2. IMPORTANCE DE L'INOCULUM

Il ne faut pas négliger l'importance de l'inoculum viral pour étudier l'action des antiviraux. De nombreux auteurs avant nous en ont fait la remarque. Nous ne citerons pour exemple ici que de RUDDER et PRIVAT de GARILHE (175) à propos du virus vaccinal et du virus herpétique, et NAFICY (156) à propos du virus Sindbis.

Les Anglosaxons appellent communément l'unité virulente une T. C. I. D. 50, c'est à dire la Dose Infectant 50 % des cellules en Culture de Tissu. De RUDDER et PRIVAT de GARILHE ont montré que si l'inoculum viral est de 1 T. C. I. D. 50 pour 1000 cellules, l'inhibition de 99 % de l'effet Cyto-Pathogène est obtenue avec une concentration de 3. 10^{-6} M de Cytosine-Arabinoside, tandis que si l'inoculum est de 20 T. C. I. D. 50 pour 1 cellule, pour obtenir le même effet, il faut une concentration de 1, 5 10^{-4} M.

Par ailleurs, les mêmes auteurs remarquent une dissociation des différents stades de l'inhibition suivant l'inoculum. Ainsi, avec un inoculum de : -50 T. C. I. D. 50 par cellule, le virus herpétique est bloqué par l'iodouracile - arabinoside, la thymine-arabinoside et l'adénine-arabinoside, sans que l'effet cyto-pathogène soit bloqué.

- moins de 1 T. C. I. D. 50 par cellule, quelques plages bien localisées se forment.

- 1 T. C. I. D. 50 pour 10 cellules, la protection par ces mêmes substances est réalisée contre l'infection et contre l'Effet Cyto-Pathogène.

KUCERA (130) montre de même que l'activité limite de l'I. U. d. R. (Iodo Désoxy Uridine) se manifeste à :
- 4,3 µg / ml si l'inoculum est de 8.10^2 particules infectantes de virus herpétique.
- 6 µg / ml si l'inoculum est de 100.10^2 particules.

Avec le virus Sindbis, NAFICY (156) obtient des résultats du même ordre en essayant l'activité de la cyclopine.
- Pour 1000. 000 T. C. I. D. 50, il faut 8 U de cyclopine pour inhiber l'Effet Cyto-Pathogène.
- Pour 1000 T. C. I. D. 50 , 4 U seulement suffisent pour obtenir la même inhibition.
- Pour 100 T. C. I. D. 50, 4 U sont nécessaires.

Nous avons obtenu, pour notre part, des résultats du même ordre. Avec par exemple la Bromo désoxy Uridine (B. U. d. R.), pour un inoculum correspondant à la formation de 20 plages par le virus Sindbis, nous avons observé une inhibition du Pouvoir-Pathogène de

- 75 % pour 5 mg/ml
- 70 % pour 1 mg/ml
- 60 % pour 0,5 mg/ml.

Avec un inoculum 3 fois plus fort (66 plages) il se produit une inhibition du Pouvoir-Cyto-Pathogène de :

- 39 % pour 5 mg/ml
- 36 % pour 1 mg/ml

La même substance, B. U. d. R. , agissant sur le virus vaccinal nous a donné les résultats suivants :

Avec un inoculum correspondant à 97 plages, il se produit une inhibition de l'Effet-Cyto-Pathogène de :

- 100 % à 10µg / ml
- 96 % à 1µg / ml

tandis qu'avec un inoculum 3 fois plus fort (272 plages) l'inhibition est de :

- 10 % à 1 µg / ml pour l'effet virulicide,
- 55 % à 1 µg / ml pour l'effet virustatique.

CHAPITRE III

ANTIVIROGRAMME

I - DISQUES

II - CYLINDRES

ANTIVIROGRAMME

Par analogie avec l'antibiogramme, nous avons essayé d'obtenir une sorte d'antivirogramme, c'est à dire des zones d'inhibition de formation des plages autour d'un disque imprégné de substance antivirale. Cette épreuve est encore appelée par les auteurs anglo-saxons " l'effet de halo ".

Différentes méthodes ont été mises au point dans des propos divers : DULBECCO et coll. (65) tout d'abord, dès 1956 ont proposé une méthode d'étude de la neutralisation du virus de l'Encéphalite Equine de l'Ouest par l'immunsérum correspondant. Cette technique, d'une remarquable précision, est relativement compliquée à éxécuter, et divers auteurs en ont réalisé des modifications qui gagnent en simplicité ce qu'elles perdent en rigueur. En particulier, parallèlement, DE SOMER et coll. (59) déterminaient en 1957 grâce à une culture de poliovirus, la présence d'anticorps correspondant dans le sérum de poliomyélitique, tandis que PORTERFIELD (168) proposait la même année une méthode générale applicable au typage des virus cytopathogènes.

En 1960 (171) PORTERFIELD utilisait la technique des perles de porcelaine trempées dans le sérum contenant les anticorps.

La même année,HERRMANN (107) proposait une méthode simple permettant de déterminer les propriétés antivirales d'une substance en utilisant comme pour les antibiotiques antibactériens des disques imprégnés de substance antivirale.

HERRMANN cultive les fibroblastes d'embryons de Poulet dans de grands plats de cuisine en PYREX et les scelle avec du papier adhésif.

Il réalise l'infection avec différents virus et coule sur les cellules infectées un milieu gélosé coloré non pas au rouge neutre, mais au chlorhydrate de Iodo-Nitro-Tétrazolium (I N T) à 90 mg pour 100ml de milieu. L'avantage de ce dernier colorant est d'être insensible à l'action de la lumière et de colorer aussi bien les cellules mortes que les cellules vivantes, ce qui permet de conserver l'essai plus longtemps.

A la surface, il dépose des disques de papier imprégnés de la substance étudiée, et séchés, puis stérilisés dans un courant de dioxyde d'éthylène.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les différentes dilutions sont proportionnels aux doses utilisées, à condition que le diamètre mesuré soit compris entre 20 et 50 mm.

Dès 1960, HERRMANN mettait en évidence par cette méthode l'activité antivirale de l'Isatine-thiosemicarbazone sur le virus vaccinal.

Pour notre part, nous avons éprouvé les plus grandes difficultés à réaliser des essais de ce type. Il faut noter toutefois que nous n'avons utilisé ni le même colorant, ni le même papier, ni les mêmes milieux de culture.

Jusqu'à ce jour, nous n'avons pu obtenir des diamètres de zones d'inhibition nettement repérables, qu'avec l'Iodo 5 uridine, à la dose de 2000 et 5000 µg / ml.

TECHNIQUE SUIVIE

La couche unicellulaire est réalisée comme nous l'avons exposé dans la première partie de ce travail. Après avoir lavé deux fois les cellules au liquide de HANKS au Tris, nous inoculons la suspension virale de manière à obtenir environ 2.10^2 plages par boite pour le virus Sindbis, ou 3 à 5.10^2 plages pour le virus vaccinal, sous un volume de 1 ml. Cette quantité correspond à la formation de plages presque confluentes, mais sans destruction totale de la culture cellulaire, ainsi que le conseillent la plupart des auteurs (58 - 107).

Les disques utilisés sont commercialisés par les " FILTRES GAUTIER " *, qualité 110 R 97, mesurant 9 mm de diamètre. Ils sont stérilisés vingt minutes à 115°C à l'autoclave et séchés 48 h à l'étuve avant l'utilisation. Ces disques, imprégnés de différentes dilutions de substances, puis égouttés sur une feuille de papier filtre stérile, sont déposés à la pince flambée ou à l'aide de deux aiguilles emmanchées flambées, sur le milieu gélosé solidifié.

* FILTRES GAUTIER , 65 rue des Coquetiers à BOBIGNY.

Devant l'absence répétée de zones d'inhibition, nous avons modifié cette technique, pensant que, peut être, la substance antivirale diffusait mal dans la gélose. Nous avons donc déposé les disques imprégnés et égouttés immédiatement après l'inoculation du virus, sur la couche cellulaire elle-même, et porté seulement alors les boites à l'étuve pour l'adsorption du virus : de cette façon, la substance antivirale est apportée pratiquement en même temps que le virus et devrait agir encore plus facilement.

Après une heure d'incubation, le milieu gélosé est coulé dans les boites en prenant garde à ne pas déplacer les disques pendant l'opération, ce qui est assez facile à réaliser si l'on verse d'abord quelques gouttes de milieu gélosé sur chaque disque pour le fixer au support.

Malgré ces modifications, les résultats ont toujours été négatifs avec les produits que nous avons essayés, même avec ceux accusant une activité virustatique ou virulicide importante.

PORTERFIELD (171) utilisant avec succès des perles de porcelaine pour ses essais de neutralisation par les sérums immuns, nous avons essayé, pour notre part, de faire diffuser la substance en solution dans les cylindres utilisés pour le dosage des antibiotiques (méthode du Codex (45)). Cette méthode nous a donné d'excellents résultats. Nous décrivons ici le protocole adopté.

Sur la couche cellulaire âgée de 18 à 24 heures et lavée deux fois, le virus est réparti de façon homogène. Les boites sont portées à l'étuve une heure à + 37°C. Le milieu gélosé de formule habituelle est alors distribué sous un volume de 5 ml pour des boites de Pétri de 5 cm de diamètre.

Après solidification du milieu, nous disposons au centre de la boite un cylindre métallique (Codex (45)), après l'avoir trempé dans l'alcool et flambé. Le cylindre encore tiède adhère bien à la gélose. Dans ce cylindre, à l'aide d'une pipette graduée, nous versons une quantité fixée arbitrairement à 100 µg de substance dissoute dans le tampon habituel. Ces 100 µg sont apportés sous un volume de 0,20 ml, qui représente la contenance maximale du cylindre (80). Selon le résultat obtenu, l'essai peut être recommencé avec des quantités inférieures (50 µg), ou supérieures (200 à 500 µg).

GAVIN (80) a étudié en détail la diffusion d'une substance dans des milieux gélosés. Il recommande :

1) d'éliminer les cylindres ébréchés ou dont la surface en contact avec la gélose ne serait pas parfaitement plane et lisse.

2) de chauffer légèrement le cylindre pour faciliter son adhérence à la gélose.

3) de déposer délicatement les cylindres : s'ils sont enfoncés profondément dans la gélose, le diamètre de la zone d'inhibition sera inférieur à ce qu'il devrait être (28).

4) de remplir complétement les cylindres : avec une même quantité de substance déposée, mais sous des volumes différents, on peut obtenir jusqu'à 18 % de variations (87).

5) de manipuler avec précaution les boites ainsi préparées, afin d'éviter de renverser le contenu des cylindres.

En tenant compte de ces conseils dans la réalisation de nos essais, nous avons effectivement obtenu une grande sensibilité et même des résultats proportionnels, comme on peut le voir d'après l'essai suivant :

Différentes concentrations de Iodo 5 désoxy 2' Uridine (IUdR), apportées sous un volume de 0,20 ml, de telle manière que le cylindre contienne 25, 50, 100, et 200 µg de substance, nous ont donné des zones d'inhibition de :

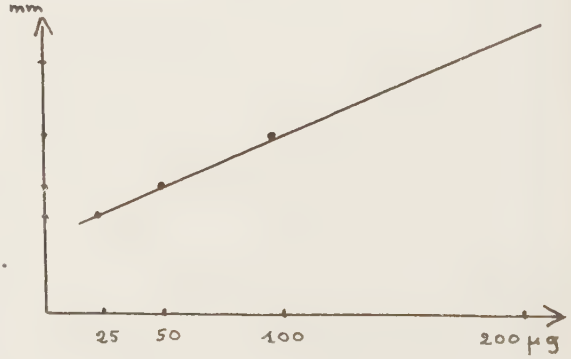
41,5 mm pour 200 µg

30,5 mm pour 100 µg

21 mm pour 50 µg

16 mm pour 25 µg

sur les plages de virus vaccinal.



CHAPITRE IV

GRADIENT DE CONCENTRATION

ou

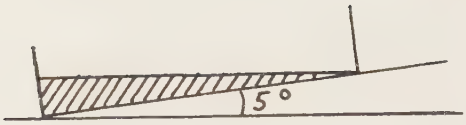
ACTIVITE LIMITE

GRADIENT DE CONCENTRATION
ou
ACTIVITE LIMITE

Nous avons ensuite cherché à appliquer la méthode de SZYBALSKI (216) qui utilise, pour le dosage des antibiotiques antibactériens, un gradient de concentration de la substance dans la gélose. KUCERA et HERRMANN ont adapté cette méthode aux substances antivirales (130). La supériorité de cette technique sur la précédente est évidente, même quant à son principe car les zones de diffusion de substances à partir d'un disque sont obligatoirement réduites, comparées à un gradient continu d'une extrémité à l'autre de la boite. De plus, elle élimine l'influence variable du papier des disques. BONDI et coll. (17) attribuent la mauvaise reproductibilité unaninement reconnue de la méthode des disques soit à la diffusion trop rapide de la substance du papier à la gélose, soit au contraire au fait que le papier a tendance à retenir le produit.

Voici comment nous avons procédé :

La culture cellulaire est réalisée selon le procédé habituel, puis est inoculée avec une suspension virale telle que les plages obtenues soient presque confluentes sans que la couche cellulaire soit détruite entièrement, ce qui fait environ 2.10^2 unités / ml pour le virus Sindbis, et 3 à 5.10^2 pour le virus vaccinal. Après une heure d'adsorption, on coule une première couche de milieu gélosé et on porte la boite sur un plan incliné, de façon à ce que le milieu affleure l'extrémité du diamètre de plus grande pente. Pour nos boites de 5 cm de diamètre, ceci est réalisé avec un support faisant un angle de 5 degrés avec l'horizontale, et un volume de milieu gélosé de 3 ml. Le volume de milieu contenu dans la boite est alors de 4 ml (1ml de suspension virale + 3 ml de milieu).

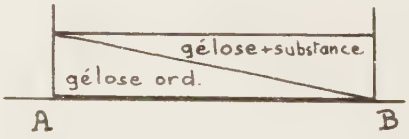


Après solidification, les boites sont replacées en position horizontale et on coule une nouvelle couche de milieu gélosé contenant la substance apportée sous un volume de 2 % du volume final et mélangée au milieu juste avant de le couler.

Nous avons vérifié, dans un premier groupe d'essais, que l'addition de 2 % de solvant pur au milieu gélosé ne modifiait en rien la formation des plages. Le solvant utilisé est le Tampon phosphaté habituel lorsque le produit est soluble dans l'eau, ou le Tampon à 10 % de D. M. S. O. lorsque le produit est insoluble dans l'eau.

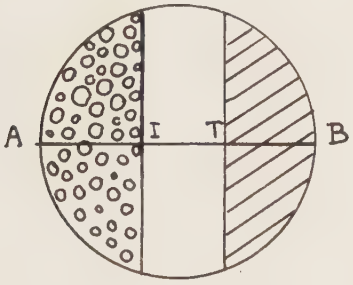
Il est important de vérifier à ce moment le pH pour ne pas attribuer à la substance une toxicité ou une activité qui serait dûe à un effet de pH.

Le milieu est alors coulé de façon à ce qu'il affleure la surface de la couche précédente au niveau de la hauteur maximale de celle-ci, ce que l'on obtient pour un volume de 4 ml, c'est à dire, évidemment, pour un volume égal à celui qui est déjà dans la boite.



On peut admettre qu'à l'extrémité A du diamètre AB de la boite (diamètre de la plus grande pente) il y a 0 % de substance et à l'extrémité B, 100 %. Après le séjour habituel à l'étuve dans les conditions de température et de temps convenant à chaque virus, on observe dans le cas le plus favorable une ligne nette où s'arrêtent les plages. Cette ligne correspond à la dose limite de substance capable d'inhiber la formation de plages. Cette dose peut être calculée en faisant le rapport des mesures de la distance de cette

ligne au point A et du diamètre intérieur de la boite, et en multipliant le résultat obtenu par la concentration maximale de la substance.



soit : $\frac{A\ I}{A\ B} \times C\ max.$

Ce calcul ainsi que la théorie du principe de la méthode ont été parfaitement discutés par SZYBALSKI (216) et nous n'y reviendrons pas.

Parmi ses très nombreux avantages, cette méthode possède en plus le mérite de mettre en évidence en même temps la toxicité de la substance en effet, si l'antiviral est toxique, on voit se dessiner une ligne au delà de laquelle les cellules sont mortes (T) ; la zone d'activité est alors (sur notre schéma) I T .

Dans la suite de nos essais, nous avons appelé cette dose I l'activité limite de la substance.

Un autre avantage de cette méthode est d'obtenir rapidement, avec un nombre d'essais limité, un résultat. Elle permet donc une détection pratique pour essayer l'activité antivirale d'une substance. Pour notre part nous utilisons trois doses : 0,1 mg - 10 mg et 1g / ml de milieu gélosé et nous obtenons toujours un résultat préliminaire qui nous permet, dans une seconde étape une détermination plus fine dans la zone où nous avons remarqué une activité.

De plus, comme le notent KUCERA er HERRMANN (130), cette méthode permet aussi la détection des virus résistants à la substance, ce qui est particulièrement visible avec l'iodo 5 désoxy 2' Uridine. (I. U. d. R.).

Dans la zone des faibles concentrations, cette technique nous a toujours donné entière satisfaction. Mais il semble qu'il n'y ait plus aucun facteur de proportionnalité lorsque la concentration maximale devient importante, sans doute parce que le produit diffuse et que le point 0 ne correspond plus

à une concentration de 0 % mais de beaucoup plus, et de façon variable suivant la rapidité de diffusion de la substance à travers la gélose.

Par contre, il est certain que si la possibilité de diffusion du produit dans le milieu gélosé est nulle ou très lente, la méthode perd tout son intérêt.

Nous avons rencontré une autre difficulté de lecture dont nous avons déjà brièvement parlé à propos des autres déterminations d'activité virulicide et virustatique. Il s'agit des substances dont le 100 % d'activité ne peut être déterminé, l'activité maximale tendant vers une certaine limite. Dans ce cas, nous voyons diminuer progressivement le nombre ou bien la taille des plages. C'est en particulier le phénomène rencontré avec l'A. B. O. B. ou Virustat. Il nous a paru alors impossible de chiffrer l'activité de ces substances par cette méthode, et nous nous sommes contentée de déterminer l'activité virulicide et virustatique, en notant toutefois la dose qui montrait une nette diminution de la taille ou du nombre des plages.

CHAPITRE V

IN OVO

- ACTIVITE VIRULICIDE
- ACTIVITE VIRUSTATIQUE

ESSAIS IN OVO

Dans ce domaine, nous avons cherché à déterminer l'activité virulicide et virustatique des mêmes substances sur le virus de la maladie de NEWCASTLE (Myxovirus multiformis), ou sur le virus grippal PR 8 pour les Ribovirus ; sur le virus vaccinal pour les Désoxyvirus

ENTRETIEN DE LA SOUCHE DE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

L'inoculation de la souche de virus de la maladie de NEWCASTLE s'effectue dans la cavité allantoidienne d'oeufs de Poule incubés de race Leghorn blanche. La technique utilisée dans le laboratoire a été décrite en détail dans la thèse de A. M. QUERO (181). Nous n'en rappellerons ici que les points essentiels.

Les oeufs incubés agés de 9 à 10 jours reçoivent 0,1 ml d'une dilution au 1/100 de la suspension virale souche, par voie allantoidienne. Puis les oeufs sont placés à l'étuve à + 38,5°C pour en continuer l'incubation.

A partir du jour de l'inoculation, ils sont mirés tous les jours. En effet, les embryons morts 24 heures après l'injection ne sont pas morts du fait de la maladie de NEWCASTLE, mais plutôt d'une lésion maladroite lors de l'inoculation, ou encore d'une contamination bactérienne. La maladie est par contre certaine 48 heures après et les embryons meurent entre 48 et 72 heures après l'injection.

Les virus sont abondants dans le liquide allantoique que nous recueillons des oeufs morts ou moribonds 48 heures après l'injection.

Le liquide obtenu doit être limpide ou louche. Un trouble abondant signe une contamination bactérienne que l'on recherche systématiquement en bouillon ordinaire pour les aérobies, et en bouillon au thioglycollate pour les anaérobies.

Les liquides allantoiques rassemblés constituent la suspension virale souche et sont répartis en ampoules scellées et conservées à - 30°C.

TITRAGE DE LA SUSPENSION VIRALE OBTENUE

La suspension virale souche est titrée par son pouvoir infectieux, le seul qui nous intéresse ici. (On trouvera les détails techniques dans la thèse de A. M. QUERO (181)).)

Cette souche est diluée en progression géomètrique de raison 1/10 dans le Tampon-Tampon sérum utilisé dans nos autres techniques. Pour effectuer ces dilutions, il est nécessaire de mélanger soigneusement le ml de suspension virale prélevé aux 9 ml de Tampon-Tampon sérum, car ces virus ont une très forte tendance à former des agrégats difficilement dissociables. Pour éviter toute cause d'erreur due au transport de ces agrégats, il faudra changer de pipette entre chaque dilution.

Puis on inoculera 0,1 ml exactement mesuré de chaque dilution à 10 oeufs embryonnés par voie allantoidienne. (Au total, on inocule donc 1 ml de matériel virulent). Les oeufs inoculés seront alors mirés tous les jours pendant 4 jours, en portant les vivants et les morts sur un tableau.

Le laboratoire a adopté la méthode de REED et MUENCH (190) pour obtenir un titre statistiquement significatif. Dans ses " Techniques de Laboratoire en Virologie humaine ", LEPINE (132) rappelle le principe de la méthode.

1°) Chaque groupe considéré doit comporter au moins 5 individus.

2°) La dilution critique (50 %) doit être encadrée au moins par deux dilutions supérieures et deux dilutions inférieures.

3°) Les résultats sont additionnés par la méthode des totaux cumulatifs, consistant à additionner pour chaque dilution tous les individus ayant succombé, comptés à partir du taux le moins concentré (puisqu'ils auraient succombé à des dilutions moins élevées) et tous les individus ayant survécu, comptés à partir du taux le plus concentré (puisqu'ils auraient résisté à des dilutions plus grandes).

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRULICIDE OU VIRUSTATIQUE

Les exigences de la matière vivante ne sont pas les mêmes lorsqu'on s'adresse à des cultures cellulaires ou à des organismes vivants complets. Aussi les méthodes que nous avons utilisés in vitro ne sont pas adaptables in ovo. En particulier, il est impossible d'inoculer un volume de 1 ml dans la cavité allantoidienne de l'oeuf incubé, le volume maximal supportable par l'oeuf embryonné de 10 jours étant environ de 0,6 ml. Nous avons choisi le volume de 0,1 ml constant pour cette série d'essais.

Les oeufs incubés utilisés sont âgés de 10 à 11 jours et sont mirés au préalable, d'une part pour vérifier leur vitalité et d'autre part pour s'assurer que l'inoculation s'effectue bien dans la cavité allantoidienne et non dans un vaisseau. Pour pratiquer cette inoculation, la coquille est d'abord désinfectée avec un tampon de coton imbibé d'alcool éthylique, puis percée à l'aide d'un foret flambé, quelques millimètres au dessous de la poche à air, dans une zone dépourvue de gros vaisseaux.

Puis l'aiguille (20 mm, 6/10, biseau court) montée sur une seringue de 1 ml graduée au 1/100, est introduite et enfoncée de quelques millimètres à travers la membrane coquillère et la membrane chorio-allantoique, de façon à ce que le liquide inoculé parvienne directement dans la cavité allantoidienne.

Après l'inoculation, la coquille est de nouveau désinfectée et la lésion du foret est obstruée avec une goutte de paraffine liquéfiée. Puis sur la coquille, nous inscrivons au crayon gras la nature de l'opération effectuée : signes conventionnels représentant la dose de virus, de substance, et le mode opératoire de l'essai.

Enfin, nous portons les oeufs à l'étuve à la température qui convient à l'essai et nous les mirons chaque jour. Les embryons morts pendant les premières 24 heures sont éliminés comme dépourvus de signification. Chaque jour, le nombre des morts est noté sur un tableau.

Comme pour les essais in vitro, nous avons cherché à définir les trois doses donnant respectivement 0 % d'activité (tous les oeufs morts)

100 % d'activité (tous les oeufs vivants) et 50 % d'activité, soit, par analogie à la D. L. 50, la dose efficace 50 % , la D. E. 50.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRULICIDE

Le volume de suspension virale inoculé étant très faible, il est nécessaire d'opérer avec une concentration en virus suffisamment grande, pour pouvoir affirmer la présence d'au moins un virus dans un volume de 0,1 ml. Il s'agit donc d'une concentration bien supérieure à celle utilisée dans nos essais in vitro. En pratique, nous avons choisi la dose de 10^4 unités infectantes (D. I. 50) par ml, qui contient donc en théorie 10^3 unités infectantes dans 0,1 ml. Même si les virus sont inégalement répartis dans la suspension, il y a au moins un virus infectieux dans le volume inoculé.

A 1 ml de cette suspension, nous ajoutons la substance en quantité voulue sous un volume de 8 ml, puis 1 ml de Tampon-Tampon sérum dont le rôle est de protéger la suspension virale contre une baisse de titre éventuelle. Après un mélange soigneux, nous laissons se poursuivre le contact pendant une heure à la température du laboratoire. Les oeufs sont ensuite inoculés selon le procédé déjà décrit à raison de 0,1 ml par oeuf, puis remis à l'étuve à + 38°C. Nous inoculons cinq (ou dix) oeufs pour chaque dose de substance.

Lecture des Résultats

En principe, les embryons infectés par le virus de la maladie de NEWCASTLE meurent dans les 3 jours qui suivent l'inoculation. Les survivants sont conservés 5 jours pour différencier l'effet de réelle neutralisation du virus d'un simple effet de retard sur le développement viral. Les oeufs sont donc mirés tous les jours et le nombre des vivants et des morts pour chaque dilution est porté sur un tableau, afin de déterminer le pourcentage de survivants en utilisant la méthode des totaux cumulatifs.

Expression des Résultats

Nous avons adopté une méthode qui s'inspire de la méthode des totaux cumulatifs de REED et MUENCH, mais en tenant compte des embryons survivants, puisque l'on cherche à déterminer une dose efficace.

Les oeufs recevant tous la même quantité de virus, nous avons admis par principe que la dose de substance pour laquelle tous les oeufs inoculés sont vivants représente la dose efficace 100 %; et que la dose de substance pour laquelle tous les oeufs inoculés sont morts représente la dose efficace 0 %. La dose efficace 50 %, D.E. 50 % , a été établie graphiquement sur papier semi-logarithmique, en admettant par analogie au titrage des virus que :

1°) Si les oeufs sont morts avec une dilution de substance ils seraient forcément morts avec une dilution plus forte, c'est à dire avec une concentration plus faible.

2°) Si les oeufs sont vivants avec une certaine dilution de substance, ils seraient forcément vivants avec une dilution plus faible, c'est à dire avec une concentration plus forte.

Ces deux affirmations ne sont valables que dans un cadre bien déterminé.

a) En effet, si la substance est active mais toxique, les embryons vont mourir du fait de la toxicité du produit.

Cette objection peut être écartée, car lorsque nous inoculons un grand nombre de dilutions différentes, la toxicité de la substance est marquée par la mort des embryons aux plus fortes concentrations, et avant que ne se manifeste l'infection, c'est à dire le lendemain de l'inoculation.

b) D'autre part, si le solvant était actif sans que le produit le soit, tous les oeufs pourraient être protégés sans que la substance en soit responsable.

Il fallait donc s'assurer que le solvant lui-même ne possédait aucun pouvoir protecteur sur les embryons, ni aucun pouvoir virulicide.

La plupart de nos essais ont utilisé comme solvant le Tampon-Tampon sérum déjà décrit, et nous avons vérifié que son inoculation aux oeufs ne modifiait pas le processus de l'incubation, tandis que l'absence d'activité

sur le virus était admise à priori, puisque c'est dans ce même tampon que se réalisent les dilutions destinées au titrage.

Il en va tout autrement quand le solvant utilisé est le Diméthyl-sulfoxyde ou D. M. S. O.

En essayant l'activité virulicide du D. M. S. O. , nous avons obtenu les résultats suivants:

Concentration de la substance	1° jour après l'injection	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour
8.10^{-1}	vvvvv	vvvv+	vvvv+	vvvv+	vvvv+	vvvv+	vvvv+
5.10^{-1}	vvvvv	vvvvv	+++++	++-++	-+++-	++++-	-++++
2.10^{-1}	vvvv+	vvvv+	+++++	-++++	+++++	+++-+	+++++
10^{-1}	vvvvv	vvvvv	+++++	+++++	+++++	+++++	+-++-

Ces résultats montrent que si à la concentration de 5.10^{-1} on n'observe aucune activité virulicide du D. M. S. O. ni aucun effet toxique, il n'en est pas de même à la concentration de 8.10^{-1}, ou 80 %. En fait, nous n'aurons jamais besoin de dissoudre une substance dans du D. M. S. O. pur (ce qui correspond, dans les conditions de notre technique à 80 % de D. M. S. O. inoculé), ni même 50 %. Le plus souvent, nous avons dissout la substance dans 1 ml de D. M. S. O. , puis complété le volume à 8 ml avec du tampon (7 ml) et ajouté 1 ml de Tampon sérum et 1 ml de suspension virale. Au total, la proportion maximale de D. M. S. O. se trouve donc à 10 %. A cette dose, il ne présente aucune toxicité ni aucune activité.

On peut donc éliminer une activité due au solvant seul.

Ces vérifications faites, nous avons donc admis les deux principes énoncés plus haut, et calculé la proportion de survivants.

Le tableau suivant montre un exemple de toxicité pour les embryons, d'activité et d'inefficacité selon les doses.

Aux concentrations 2.10^{-3} et 10^{-3}, la Naphtoquinone 1-2 présente une toxicité certaine qui se manifeste par la mort de la totalité ou d'une partie des embryons dès le lendemain de l'inoculation.

Entre les concentrations 5.10-4 et 5.10^{-5}, les virus ont été entièrement tués par contact, puisqu'aucun oeuf n'a développé d'infection.

Aux concentrations suivantes, l'action virulicide n'est pas totale, et si une grande proportion de virus est tuée, il en reste suffisamment pour que quelques embryons développent une infection mortelle.

A partir de 4.10^{-6}, la Naphtoquinone 1-2 n'est plus du tout active dans les conditions de cette technique. Nous avons donc appelé cette dose le 0 % d'activité. De même, nous avons attribué le 100 % d'activité à la plus faible dose qui protégeait tous les oeufs, c'est à dire, ici, 5.10^{-5}

Activité de la Naphtoquinone 1-2

Dose de substance mise en contact avec le virus	Nombre d'oeufs inoculés	le lendemain		après 5 jours	
		morts	vivants	morts	vivants
2.10^{-3}	5	5	0		0
10^{-3}	5	2	3		3
5.10-4	5	0	5	0	5
2.10^{-4}	10	0	10	0	10
7.10^{-5}	10	0	10	0	10
5.10^{-5}	10	0	10	0	10
2.10^{-5}	8	0	8	2	6
10^{-5}	8	0	8	5	3
7.10^{-6}	5	0	5	2	3
4.10^{-6}	5	0	5	5	0
2.10^{-6}	5	0	5	5	0

En adoptant la méthode des totaux cumulatifs, le tableau précédent se trouve ainsi transformé :

Concentration de la	Nb d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Totaux cumulatifs		% survivants
				Morts	Vivants	
5.10^{-5}	10	0	10	0	22	100 %
2.10^{-5}	8	2	6	2	12	85 %
10^{-5}	8	5	3	7	6	46 %
7.10^{-6}	5	2	3	9	3	25 %
4.10^{-6}	5	5	0	14	0	0 %

La proportion de survivants est calculée ligne par ligne par rapport au total des oeufs comptés dans les deux colonnes des totaux cumulatifs , c'est à dire 22 pour la première ligne horizontale ,

14 pour la seconde ,

13 pour la troisième , etc...

AUTRES VIRUS QUE CELUI DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

Certaines substances ont été étudiées sur le virus de la vaccine (Cytosine arabinoside - Méthysazone) une autre sur le virus de la grippe PR8.

A - Essais avec le virus vaccinal

L'inoculum viral est dans ce cas déposé sur la membrane chorio-allantoïque en utilisant le procédé décrit dans la méthode d'entretien de la souche du virus vaccinal.

La lecture des résultats se fait dans les mêmes conditions : les oeufs sont cassés dans une boite de Pétri stérile, les membranes chorio-

allantoïques sont prélevées et étalées dans une autre boite de Pétri contenant du sérum physiologique de façon à dénombrer les pustules. On porte sur un tableau le nombre de pustules formées sur chaque membrane chorio-allantoïque et on compare la moyenne obtenue à la moyenne des résultats observés avec cinq oeufs témoins inoculés avec une dilution de virus identique.

La différence entre ces deux moyennes représente l'inhibition de la formation de pustules c'est à dire l'activité de la substance.

Cet essai n'est réalisable qu'à condition d'inoculer une dose de virus qui ne provoque pas l'apparition de pustules confluentes : il faut pouvoir les compter. Mais il faut un inoculum suffisamment important pour éviter une trop grande dispersion des résultats, difficulté qui ne serait levée que par l'emploi d'un très grand nombre d'oeufs.

B - Essai réalisé avec le virus de la grippe PR 8 -

Le développement de ce virus en oeuf incubé ne conduit pas à la mort de l'embryon mais à la formation d'hémagglutine active sur les hématies de Poulet.

On trouvera les détails concernant le titrage de ce virus dans la thèse de A. M. QUERO (181). Nous ne rappellerons ici que ce qui est nécessaire à la lecture des résultats.

La dose de virus inoculée ne doit pas être trop importante sinon, il se forme des virions incomplets (244) non infectieux, non antigèniques, ne conduisant donc pas à l'apparition d'hémagglutine.

Nous avons choisi de mettre en contact la substance avec 10^4 virus environ, ce qui correspond à un pouvoir hémagglutinant certain chez l'oeuf inoculé.

L'incubation se poursuit à + 35°C et le troisième jour suivant l'inoculation, on rassemble les liquides allantoïques des Oeufs de chaque série de dilutions, de façon à titrer le pouvoir hémagglutinant restant après l'action du virulicide

Le titrage du pouvoir hémagglutinant est réalisé sur plaques à alvéoles d'usage unique, adaptée aux micro-méthodes.

Les répartitions sont effectuées à l'aide d'une seringue B. D. (Mérieux)

Les hématies de Poulet sont obtenues à partir des vaisseaux lésés de cinq oeufs embryonnés de 15 jours environ. Ces hématies sont lavées dans le tampon habituel et diluées à 1 % dans ce même tampon. Pour le titrage du pouvoir hémagglutinant, on met en présence des volumes égaux de dilutions de liquide allantoïque et de suspension d'hématies. La réaction se poursuit à la température du laboratoire.

L'hémagglutination se traduit par un fin agglutinat réparti uniformément le fond de l'alvéole, tandis qu'une réaction négative montre un anneau d'hématies sédimentées, le centre de l'alvéole restant clair.

Détermination de l'activité virustatique

Cinq jours de suite, les oeufs reçoivent différentes concentrations de la substance étudiée sous un volume de 0,1 ml. Le dernier jour, ils sont inoculés avec 0,1 ml de suspension virale diluée, immédiatement après l'injection protectrice. Les jours suivants, les oeufs sont mirés et comme dans le cas précédent, les vivants et les morts sont dénombrés.

Les mêmes calculs sont réalisés de façon à obtenir les doses 100 %, 50 % et 0 %.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

SUBSTANCES ANTIVIRALES

Les substances réputées antivirales sont devenues en peu de temps innombrables sans que l'on puisse pour autant nommer une substance qui agisse spécifiquement sur les virus et rien que sur eux, et dont l'action soit complète.

Comme dans le domaine des antibiotiques antibactériens l'idéal serait de déterminer la substance spécifiquement inhibitrice d'une famille ou d'une espèce de virus. Cela semble être le cas par exemple pour l'adamantanamine (amantadine) qui serait active sur le Myxovirus de la grippe A2 et seulement sur lui (198). Le même phénomène se retrouve avec les dérivés de la thiocarbazone vis à vis des Pox comme nous le verrons plus loin ; il ne nous parait pas possible d'assimiler à ce phénomène l'action prétendue spécifique de quantité de substances sur les herpes virus dans la mesure où l'on connait très mal l'interaction des différentes processus tant psychiques que biologiques qui conduisent à la récidive des herpès humains.

De plus les substances qui se sont révélées très actives in vitro, en culture cellulaire, peuvent se révéler inactives in vivo et inversement, on a vu des drogues agir in vivo sans pouvoir retrouver cette action in vitro, probablement parce que l'effet de la drogue est virustatique et non virulicide et ne fait donc pas disparaître le virus. Ainsi des souris infectées avec le virus de l'Influenza peuvent paraître cliniquement guéries sans que les virus soient éliminés de leurs poumons.

Dans son excellente revue des connaissances actuelles dans le domaine des substances antivirales, LEPINE en dresse une classification (133) que nous allons rapidement retracer, afin de situer les substances que nous avons étudiées dans le contexte des séries chimiques actuellement explorées.

En dehors des vaccins et sérums qui constituent la thérapeutique préventive de choix en cas d'épidémie virale pour les viroses aigües et en dehors de l'interféron étudié par d'autres chercheurs du laboratoire les efforts de recherche se poursuivent dans six directions différentes.

1 - LES ENZYMES -

De nombreux enzymes se sont révélés actifs soit au stade de la synthèse des acides nucleiques soit par action directe sur ces acides. In vitro on a reconnu une activité certaine à bon nombre d'enzymes de crustacés de mollusques, de sucs végétaux. Mais les essais sur l'animal sont jusqu'à maintenant restés négatifs sans doute parce que ces enzymes sont rapidement métabolisés in vivo.

Le venin de Vipère de RUSSEL demême que le lysozyme ont été utilisés sans succès.

La Ribonucléase est l'enzyme le plus utilisé actuellement au niveau du Laboratoire de recherche.

2 - LES ANTIBIOTIQUES -

N'ont guère dépassé le stade de l'expérimentation dans le domaine des viroses. Par contre ils se sont révélés antitumoraux et sont utilisés à ce titre. C'est le cas en particulier de la Mitomycine C, de l'Actinomycine D et de la Puromycine.

D'autres antibiotiques comme l'Hélénine, le Statolon, la Noformicine dont l'activité a été expérimentalement reconnue semblent être abandonnés à l'heure actuelle. Le Statolon semble pourtant particulièrement intéressant. En suspension, au microscope électrique, il se présente comme un ensemble de particules semblables à des virus qui ne sauraient être que parasites de végétaux (extraits d'un Pénicillium). S'il est actif sur les viroses animales il y aurait là un phénomène d'interférence entre des virus végétaux et des animaux (128).

3 - LES AGENTS ALKYLANTS -

Sont reconnus pour être surtout antimitotiques : anticancéreux et antileucémiques plutôt que antiviraux.

4 - LES ANTIMETABOLITES

Représentent certainement le domaine le plus intéressant de la chimiothérapie antivirale. Ces antimétabolites, fournis à la cellule au moment de la duplication de l'ac. nucleique conduisent à la formation de produits imparfaits ou inactifs. Ces antimétabolites appartiennent soit à la série des isomères optiques ou à celle des analogues substitués de certaines amines : phénylsérine (PONS et PRESTON 1961), fluoro-phénylalanine pour la formation de la protéine virale (167).

Dans le domaine de la déviation de la synthèse des acides nucleiques, le champ est beaucoup plus vaste.

Les aminoptérines et le métothréxate sont surtout utilisés dans la thérapeutique des leucémies. Les premiers antimétabolites synthétisés étaient des analogues de bases puriques et pyrimidyques. L'uracile substitué a été particulièrement étudié avec le : 5 Fluoro uracile ou F U

5 Bromo - - B U

5 Chloro - - Cl U

5 Iodo - - I U

Puis les ribosides de ces substances soient :

5 F.U.R., 5 B.U.R., 5 Cl U R, 5 I U R

et enfin leurs désoxyribosides : 5 F U d R, 5 B U d R, 5 Cl U d R, et 5 I U d R.

Cette dernière série et en particulier l'Iodo 5 désoxy 2' uridine, s'est révélée particulièrement active sur les virus à A.D.N.

Dans le domaine des antimétabolites de synthèse dont l'usage en thérapeutique parait intéressant, il faut citer les arabinosides, nucléosides artificiels où les bases puriques et pyrimidiques sont liées non pas au ribose ou au désoxyribose mais à l'arabinose. Ces nucléosides existent à l'état naturel dans des éponges de la mer des Caraïbes et y ont été découvert par BERGMANN et coll (14). Ils ont été par la suite synthétisés par de nombreux chercheurs en particulier par TODD et coll . FOX et coll. HUNTER et coll. (26, 78 , 114).

Si ces substances paraissent totalement inactives sur les virus à A.R.N.

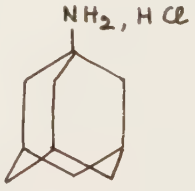
elles sont au moins aussi intéressantes que les désoxyribosides substituées sur les virus à A. D. N., avec l'avantage de provoquer peut être moins de mutants résistants. J. de RUDDER et PRIVAT de GARILHE ont particulièrement bien étudié les produits de cette série (58), de même que leurs nucléotides : les arabinosides phosphatés.

5 - LES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES AUTRES QUE LES ANTIMETABOLITES que FOLIGUET et SCHWARTZBROD (77) appellent inhibiteurs sélectifs -

a) les dérivés du benzimidazole -

D'après les travaux de TAMM, EGGERS et TAMM (68, 220, 222) ils se sont révélés antiviraux. Le plus actif de cette série serait le 2 α(hydroxybenzyl) benzimidazole (H. B. B.) dont le mécanisme d'action est encore mal connu.

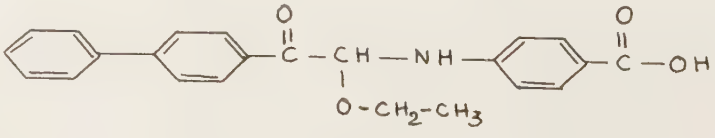
b) l'adamantanaminne ou amantadine -



active sur le myxovirus de la grippe A2.

c) les dérivés de diphényl céto aldéhydes -

Spécialisés en Italie sous le nom de Xénalamine pour l'acide p α(éthoxy-paradiphénylacylamino) benzoïque et Xenaldiale pour le dihydrate de 4, 4' bis-diphényl 3 glyoxal. Ces substances ont été étudiées par l'école italienne, en particulier par MAGRASSI et al, CAVALLINI et al., ALTTUCCI et coll., CALLONGHI, LEONARDI, etc... Il semble certain que la Xénalamine par exemple, ingérée dès les premières heures de l'infection grippale, possède une action remarquable sur l'évolution de la maladie. Le phénomène a été retrouvé pour le virus herpétique. L'action sur les autres viroses est controversé.



d) la guanidine et ses dérivés ont paru d'autant plus intéressants qu'ils ne sont pas toxiques aux doses virustatiques. La guanidine elle-même et le N'_1, N'_1 - anhydrobis (hydroxy-éthyl) biguanide ou Flumidin ou ABOB spécialisé en FRANCE sous le nom de Virustat ont été utilisés en thérapeutique. Leur action serait plus virustatique que virulicide (51 - 72)

6 - LES DERIVES DES CORPS AYANT UNE ACTION ANTIBACTERIENNE

De telles substances peuvent intervenir soit au niveau de la pénétration du virus dans la cellule, soit au niveau de la synthèse ou de la libération des virions.

Le principe de la recherche de ces produits est le suivant : en partant d'une substance antibactérienne on apporte à sa molécule diverses modifications en vue d'obtenir une action antivirale. Ainsi un dérivé de l'urée, le paradiéthyl-benzamidodithiobiuret ou G 812 synthétisé par A. GIRARD a été utilisé avec succès contre la poliomyélite par SEDAILLAN, BERTOYE et coll. à Lyon.

On a reconnu à l'uréthane une certaine action sur le virus de la grippe (141). Il semble que dans ce domaine les dérivés de la thiosemicarbazone soient particulièrement intéressants. L'isatine-thiosemicarbazone active in vitro et in vivo sur les Pox-virus et surtout la N-méthylisatine thiosemicarbazone commercialisée sous le nom de Marboran, a fait ses preuves dans une épidémie de variole à Madras. D'excellents résultats ont été obtenus avec une autre thiosemicarbazone la 4-bromo 3 -méthyl-isothiazole 5-carboxaldéhyde-thiosemicarbazone (M et B 7714).

Parmi toutes ces séries de substances antivirales, nous avons choisi d'étudier une ou deux substances de différentes séries chimiques plutôt qu' une série entière.

La bibliographie se rapportant à ces différentes séries de substances antivirales est beaucoup trop vaste pour être intégralement rapportée dans cette étude. Nous n'avons donc cité ici que les travaux qui pouvaient intéresser la partie pratique de ce sujet, c'est à dire ceux ayant trait aux techniques, aux méthodes d'études et à l'interprétation des résultats obtenus.

LES ENZYMES

- RIBONUCLEASE

- TRYPSINE

LES ENZYMES

Nous avons dit plus haut que si le lysozyme avait été préconisé comme antiviral, il n'était pratiquement plus utilisé à l'heure actuelle.

La ribonucléase, au stade expérimental, semble beaucoup plus active et plus efficace. Cet enzyme est surtout utilisé comme antitumoral (5). Son activité antivirale a été essayée aussi sur le virus vaccinal (232).

Les enzymes protéolytiques ont été aussi proposés comme antiviraux dans la mesure où l'on imagine qu'ils peuvent agir sur les protéines virales. Malheureusement ils semblent plutôt agir sur le système cellulaire hôte, ce qui a souvent pour effet de favoriser au contraire la multiplication virale (85). Cette augmentation peut être le résultat de très nombreux processus différents. Il est possible que de nombreuses plages dont le diamètre est inférieur au pouvoir séparateur de l'oeil (les infraplages de LINDENMANN (138)) deviennent visibles. Il est possible aussi que les interactions virus-cellule contribuent à la limitation de la taille des plages par accumulation locale d'interféron, la trypsine pouvant détruire cet interféron.

D'autres auteurs ont montré l'augmentation de l'infectiosité des réovirus par les enzymes protéolytiques (209, 248).

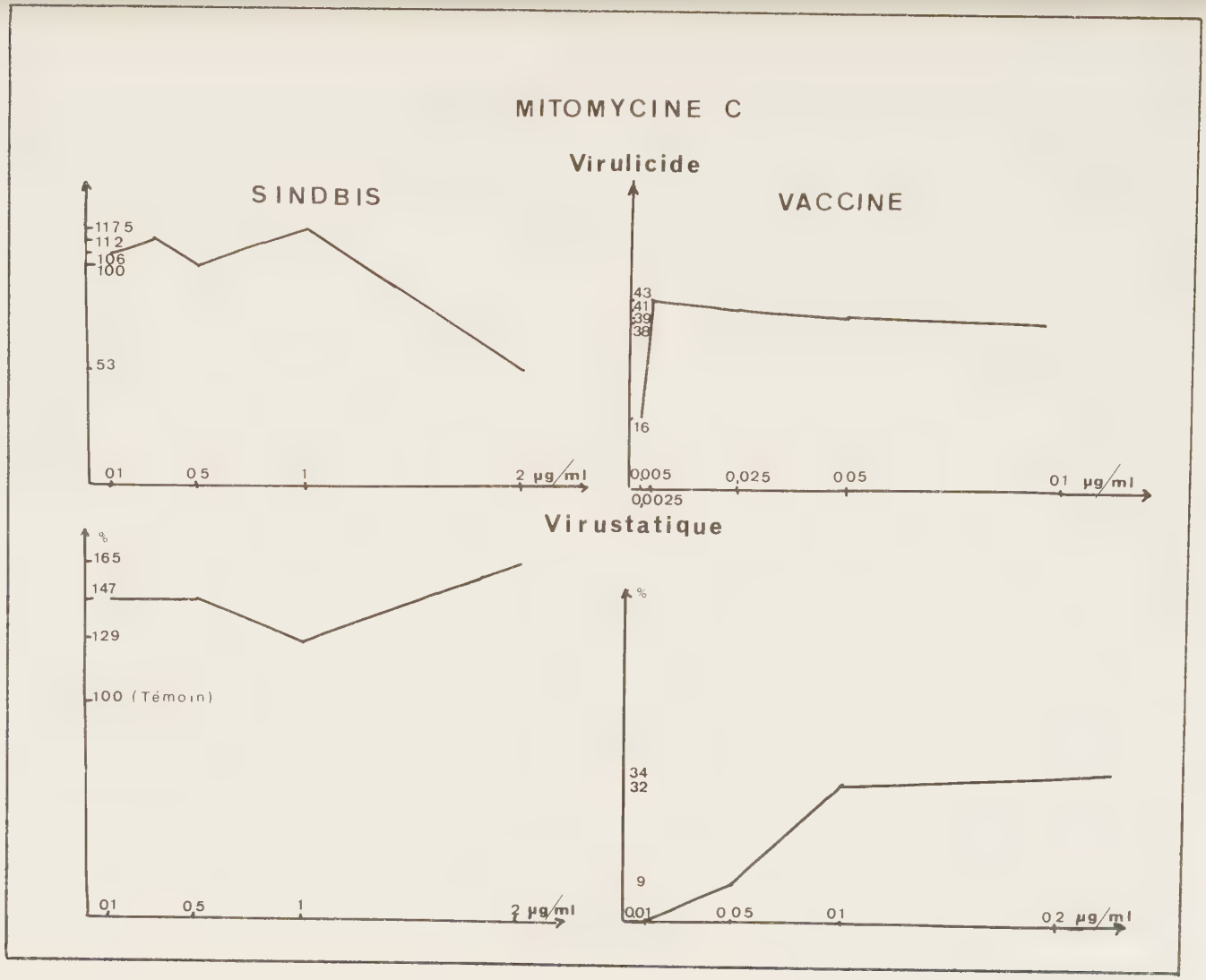
Pour notre part nous avons essayé l'action de la trypsine sur le virus vaccinal, selon notre protocole habituel. La trypsine est celle que nous utilisons pour la préparation de la culture cellulaire et nous en avons effectué la dilution dans le tampon-sérum comme pour les essais des antiviraux;. Au dessus de la concentration de 0,20 mg/ml; les cellules se détachent de la boite en matière plastique et empêchent la poursuite de l'essai.

Moyenne du nombre de plages		Dose utilisée/ml
1er essai		
	46	0,20 mg
	35	0,10 mg
	186	0 (témoin)
2ème essai		
	123	0,20 mg
	90	0,10 mg
	272	0 (témoin)

Donc si nous observons une augmentation significative entre les 2 doses 0,20 et 0,10 mg/ml, nous ne voyons aucune augmentation par rapport à la culture témoin. Ces différences de résultat avec les essais de GIFFORD (85) proviennent sans doute du fait que ses témoins contenaient de la trypsine neutralisée par un inhibiteur alors que les nôtres ne renfermaient que la suspension virale.

LES ANTIBIOTIQUES

- MITOMYCINE C


MITOMYCINE C
Virulicide
SINDBIS
1175
112
106
100
53
01
0 5
1
2 µg/ml
VACCINE
43
41
39
38
16
0,005
0,0025
0,025
0 05
01 µg/ml
Virustatique
%
165
147
129
100 (Témoin)
01
0 5
1
2 µg/ml
%
34
32
9
001
0 05
01
0 2 µg/ml

LES ANTIBIOTIQUES

MITOMYCINE C

D'autres chercheurs au laboratoire ont montré que la mitomycine libérait le phage des Staphylocoques TWORT parasités par le prophage : ces travaux sont en accord avec ceux de MUSCHEL et SCHMOKER (155).

Nous avons essayé de voir comment se comporte cette substance dans nos systèmes hôte-virus, soit en favorisant le développement viral, comme celui des bactériophages, soit en l'inhibant comme pour les bactéries.

Activité limite :

Nous n'avons pas observé d'activité, ni dans un sens, ni dans un autre sur les virus Sindbis et vaccinal. Il n'y avait en effet ni diminution de taille ou de nombre des plages, ni augmentation qui soient significatives. Les plages étaient réparties de façon homogène sur toute la surface de la boite.

Activité virulicide et virustatique

VIRUS SINDBIS Témoin = 34

Activité virulicide				Dose	Activité virustatique			
m	T-m	$\frac{T-m}{T} \times 100$	$\frac{m}{T} \times 100$		m	T-m	$\frac{T-m}{T} 100$	$\frac{M}{T} 100$
18	16	47	53	2 µg	56	-22	-65	165
40	-6	-17,5	117,5	1 µg	44	-10	-29	129
34	0	0	100	0,5 µg	50	-16	-47	147
38	-4	-12	112	0,5 µg	50	-16	-47	147
36	-2	-6	106	0,01 µg				

VIRUS VACCINAL Témoin = 100

Activité virulicide			Dose par ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	0,20 µg	66	34	34
62	38	38	0,10 "	68	32	32
61	39	39	0,05 "	91	9	9
59	41	41	0,025 "	-	-	-
57	43	43	0,01 "	101	0	0
84	16	16	0,005 "			

CONCLUSION

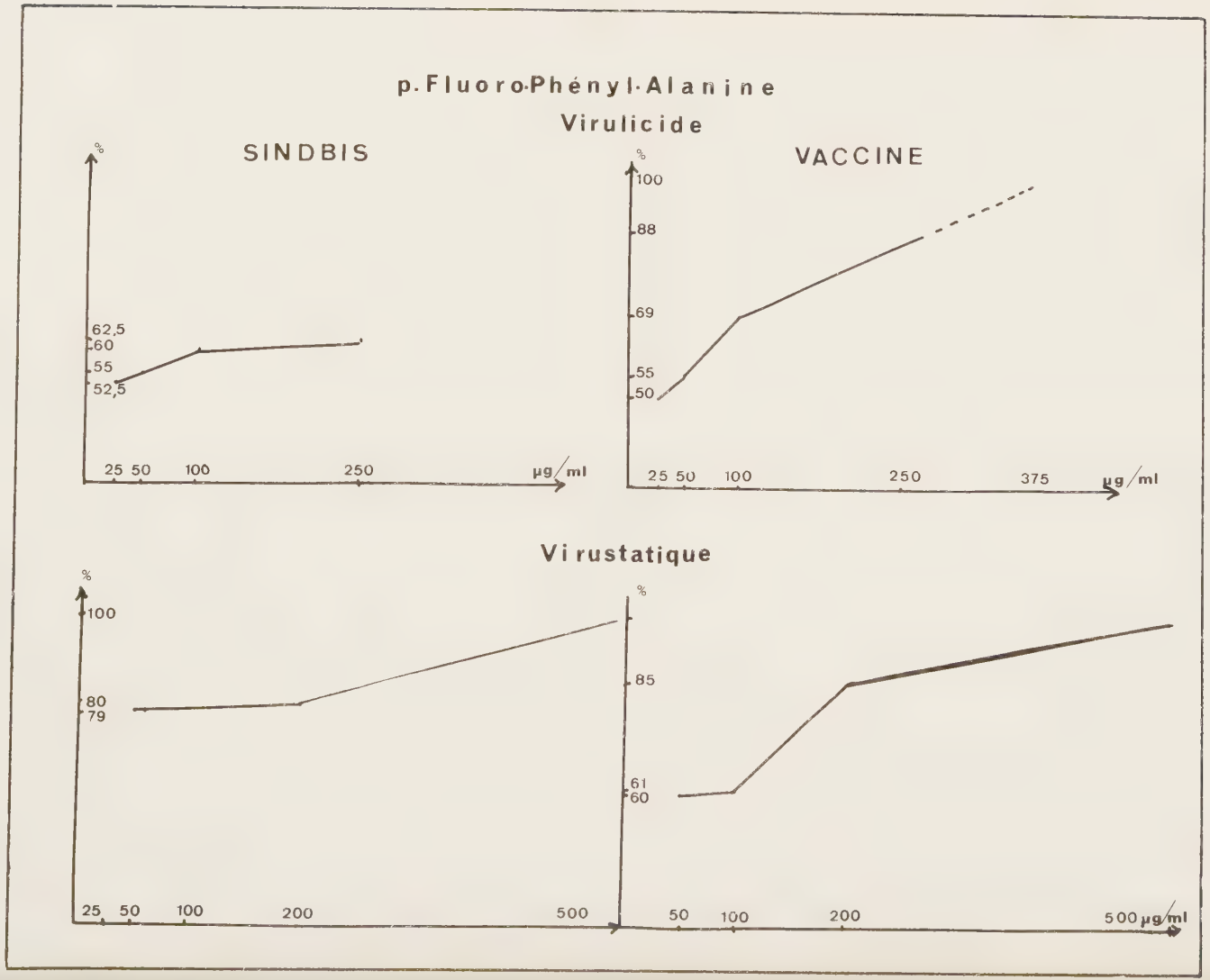
Ces résultats permettent de conclure que la Mitomycine se comporte différemment selon le virus en cause. Avec le virus Sindbis nous assistons à une augmentation de la cytogénopathogénicité tandis qu'avec le virus vaccinal la mitomycine se comporte comme un antiviral actif et peu toxique.

LES ANTIMETABOLITES

- Historique
- Analogues des acides aminés
  - P. Fluoro-phényl-alanine

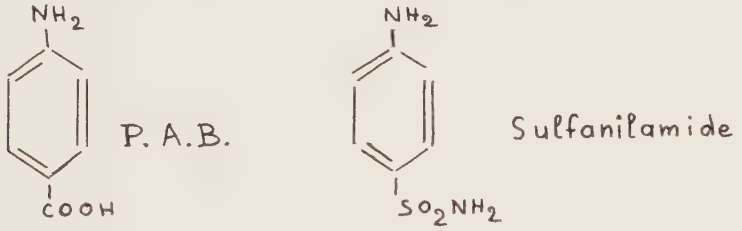
- Analogues des bases pyrimidiques
  - I - Aza pyrimidines
    - Aza 6 uridine
    - Aza 6 cytidine
  - II - Pyrimidines halogénées
    - Fluoro 5 uracile
    - Iodo 5 uridine
    - Iodo 5 désoxy 2' uridine
    - Bromo 5 désoxy 2' uridine

- Analogues du pentose
  - Arabinosides
    - Cytosine Arabinoside.


p. Fluoro-Phényl-Alanine
Virulicide
SINDBIS
%
62,5
60
55
52,5
25 50 100 250 µg/ml
VACCINE
%
100
88
69
55
50
25 50 100 250 375 µg/ml
Virustatique
%
100
80
79
25 50 100 200 500
%
85
61
60
50 100 200 500 µg/ml

LES ANTIMETABOLITES

La notion d'analogie structurale et d'inhibition compétitive remonte à 1940, lorsque WOOD (259) rapporta que l'acide paraaminobenzoïque (P. A. B) inhibait l'action bactériostatique du paraaminophénylsulfamide découvert quelques années auparavant par TREFOUEL. WOOD interpréta parfaitement le phénomène : l'acide paraaminobenzoïque sert de vitamine à la bactérie et le sulfamide interfère avec l'utilisation de cette vitamine, par analogie structurale entre les deux substances.



Nous savons maintenant que le P. A. B. est utilisé par la bactérie pour élaborer l'acide folique, coenzyme jouant un rôle très important dans le métabolisme bactérien.

Ce phénomène a été le point de départ de la recherche systématique d'autres antimétabolites aussi bien dans le domaine de la bactériologie que dans celui, moins défriché, de la virologie.

ANALOGUES STRUCTURAUX DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLEIQUES

Rappel de la constitution des acides nucleiques

Depuis les célèbres travaux de WATSON et CRICK (250) on sait que l'acide désoxyribonucléique est constitué par une double hélice de deux chaînes formées de l'association de nombreux nucléotides.

Chacun de ces nucléotides comprend une base azotée soit purique, soit pyrimidique, liée par une liaison osidique au carbone I d'un pentose qui est le ribose dans le cas des acides ribonucléiques (ARN) et le désoxy-2 ribose dans le cas des acides désoxyribonucléiques. Le carbone en 5 porte une fonction alcool primaire qui est estérifiée par une molécule d'acide phosphorique.

Le complexe base-pentose est nommé nucléoside tandis que l'ensemble base-pentose-acide phosphorique s'appelle nucléotide. Dans le tableau suivant, nous avons groupé les bases puriques et pyrimidiques rencontrées dans les ARN et ADN ainsi que le nom des nucléosides et nucléotides correspondants.

De très nombreux analogues structuraux ont été étudiés depuis 1955, tout d'abord des analogues de la base purique ou pyrimidique, puis du pentose.

I) Analogues des bases puriques :

Nous nous contenterons de citer la 6-mercaptopurine, la thioguanine, la 8-azaguanine, la 2-6 diaminopurine.

II) Analogues des bases pyrimidiques :

Azapyrimidines

Pyrimidines halogénés

III) Analogues du pentose

Arabinosides.

A R N

Bases puriques	Nucléosides	Nucléotides
Adénine	Adénosine	AC. adénylique
Guanine	Guanosine	Ac. guanylique

Bases pyrimidiques	Nucléosides	Nucléotides
Uracile	Uridine	Ac. uridylique
Cytosine	Cytidine	Ac. cytidylique

A D N

Bases puriques	Nucléosides	Nucléotides
Adénine	d. Adénosine	Ac. d. adénylique
Guanine	d. Guanosine	Ac. d. guanylique

Bases pyrimidiques	Nucléosides	Nucléotides
Thymine	Thymidine	Ac. thymidylique
Cytosine	D. Cytidine	Ac. d. cytidylique

d. = désoxy (du désoxyribose)

ANTIMETABOLITES DES PROTEINES VIRALES

p. Fluoro phénylalanine

Lorsque ACKERMANN et coll, (1, 2), montrèrent en 1954 que la p. fluorophénylalamine inhibait le développement du polivirus et de l'influenza, le mode d'action de ce produit parut très simple : l'analogue de l'acide aminé inhibait la synthèse des protéines (251).

En fait les choses ne sont pas aussi simples, comme l'ont montré des travaux plus récents. En effet il semble que la synthèse continue des protéines soit nécessaire pour la production d'A. R. N. viral infectieux, tout au moins dans le cas du virus de l'Encephalite Equine de l'Ouest. De plus lorsqu'une faible concentration de p Fluorophényl Alanine (F. P. A.) permet une synthèse protéique normale, l'ARN infectieux se forme, mais les virions sont incomplets (113-114). Il semble qu'en présence de l'antimétabolite, il s'élabore des structures voisines de celle du virus normal, mais avec une irrégularité et une labilité anormales surtout dans la capside.

WECKER (253) s'est demandé s'il y avait un gradient de sensibilité à la Fluorophénylalamine au cours du cycle viral. Finalement il semble que les protéines impliquées dans la replication de l'A. R. N. viral soient relativement insensibles, tandis que le processus de maturation virale paraît hautement sensible. C'est d'abord la capacité pour les protéines structurales de participer à la formation de virions complets infectieux qui est perdue. Lorsque l'antimétabolite s'intègre en proportion de plus en plus forte dans les subunités de protéines, celles-ci deviennent incapables de former même des virus défectifs. Si la concentration de p. fluoro phenylalanine augmente encore, l'A. R. N. polymérase, et peut être d'autres protéines nécessaires, est inhibée et la synthèse protéique de l'antigène ne peut plus se produire non plus (199-200).

ESSAIS REALISES AVEC LA FLUORO PHENYL ALANINE

ACTIVITE LIMITE

VIRUS SINDBIS

Pour une concentration maximale de 500 µg / ml dans le milieu gélosé, nous n'avons pas obtenu de suppression totale des plages pour une certaine dose, mais des plages de la taille de pointe d'épingle, que l'oeil nu peut à peine discerner. Ceci apparait à une distance moyenne de 2,10 cm, ce qui correspond à une activité limite de 215 µg / ml.

VIRUS VACCINAL

Pour une concentration maximale de 500 µg / ml, l'activité limite se manifeste à 0,95 cm, ce qui correspond à une dose de 205 µg / ml. LES plages sont normales.

ACTIVITE VIRUSTATIQUE ET VIRULICIDE

VIRUS SINDBIS Témoin = 40

Activité virulicide			Dose / ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	500 µg	0	40	100
15	25	62,5	250 µg	-	-	-
-	-	-	200 µg	8	32	80
16	24	60	100 µg	8	32	80
18	22	55	50 µg	8	32	80
19	21	52,5	25 µg			

VIRUS VACCINAL Témoin = 186

Activité virulicide			Dose / ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	500 µg	0	186	100
21	165	88	250 µg	-	-	-
-	-	-	200 µg	28	158	85
58	128	69	100 µg	72	114	61
84	102	55	50 µg	74	112	60
92	94	50	25 µg	-	-	-

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons les résultats groupés dans le tableau ci-dessous :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	-	25 µg	-	375 µg	25 µg	-
Activité virustatique	500 µg	-	-	500 µg	-	-
Activité limite	210 µg / ml			205 µg / ml		

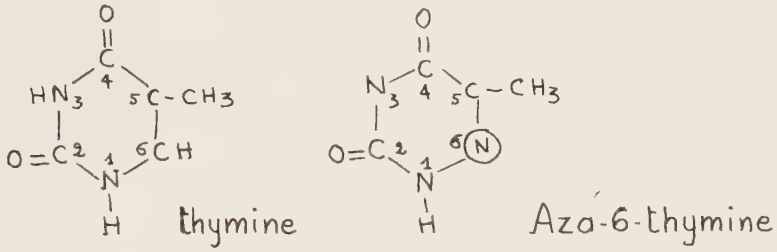
CONCLUSION

On remarque ici une similitude totale entre les doses actives sur le virus SINDBIS et le virus Vaccinal. Cela n'est pas surprenant puisque la Fluoro phényl alanine est un antimétabolite de la synthèse des protéines. Le virus vaccinal est plus riche en protéines que le virus Sindbis : il semble donc que la proportion de protéines n''entre pas en ligne de compte dans le phénomène de l'inhibition. Divers auteurs proposent d'ailleurs des doses du même ordre pour empêcher la multiplication du Poliovirus.

I) AZAPYRIMIDINES

Définition :

Les azapyrimidines sont des pyrimidines dans lesquelles un atome de carbone est remplacé par un atome d'azote ; exemple la 6-azathymine s'écrit :



Les azapyrimidines synthéthisées sont nombreuses , citons à titre d'exemples :

- Aza-6-thymine
- Aza-6-uracile, aza-5-uracile
- Aza-6-cytidine
- Acide aza-5-orotique

Les dérivés ribosylés ou désoxyribosylés sont plus actifs (182).

Mécanisme d'action

Les antimétabolites sont inhibiteurs du métabolisme de la base normale analogue. Cette inhibition est réversible, il suffit d'ajouter au milieu un excès de base normale pour voir disparaître l'effet de l'antimétabolite (207, 210). La compétition n'a pas lieu au niveau de la même réaction suivant l'azapyrimidine envisagée. Ainsi la aza-6-thymine inhibe la méthylation des précurseurs

de la thymidine. Dans l'ADN formé, on retrouve de l'aza 6 - thymidine 5' triphosphate.

L'aza 6 - uracile, antimétabolite de l'uracile et de la cytosine, agit sous sa forme ribosylée, aza 6 - uridine au niveau de l'uridine kinase, puis au niveau de la décarboxylase de l'acide orotique (93-95)

L'aza 6 - cytidine agirait comme inhibiteur de la décarboxylase de l'acide orotidylique (93-95-208)

L'aza 5 - uracile et l'acide aza 5 - orotique (100 fois plus actif que le précédent) inhibent la pyrophosphorylase de l'acide orotidylique ainsi que la formation de l'acide orotique (208).

Dans cette série, nous avons étudié l'aza 6 - uridine et l'aza 6 - cytidine. Nous empruntons à SKODA (208) les schémas d'activité biochimique de ces substances.

AZA 6 - URIDINE

L'aza 6 - uridine est la forme ribosylée active du 6-aza uracile. Ce composé entre d'abord en compétition entre l'uridine au niveau de l'uridine kinase qui transforme cette dernières en aza 6 - uridine 5' -monophosphate. Cette substance est un inhibiteur puissant de la décarboxylase de l'acide orotique (93-95). Cette inhibition représente un phénomène très important car cet enzyme catalyse la synthèse de toutes les pyrimidines. Le pH optimal de l'inhibition de la décarboxylase est compris entre 6 et 7. L'aza uridine est capable elle aussi d'entraver l'action de l'enzyme mais à des concentrations beaucoup plus fortes et à un pH plus bas (5 à 6).

L'aza 6 - uridine agit encore au niveau de la phosphorylase polynucléotide enzyme relativement insensible aux inhibitions chimiques classiques. Elle agit en interdisant l'échange des phosphates et en empêchant la polymérisation des nucléosides 5'diphosphate (209). Il y a donc une seule polynucléotide-phosphorylase pourvue d'affinités différentes pour divers nucléotides, tant à base purique qu'à base pyrimidique. De plus l'aza 6 - uridine agit au niveau de l'incorporation des acides aminés dans les ARN solubles.

EFFETS BIOLOGIQUES DE L'AZA 6 - URIDINE

Effet antitumoral

Cette substance a d'abord été essayée sur les cultures cellulaires de tissu tumoral : sarcome 180 et tumeur ascitique d'EHRLICH. Chez l'homme après injection de aza 6 - uridine,on retrouve le produit dans la tumeur à une concentration bien supérieure à celle de tous les autres tissus. Malheureusement la substance est très rapidement excrétée dans l'urine et il faudrait pouvoir former un dépôt dans la tumeur pour prolonger l'action de l'antimétabolite.

De plus, dans le tissu tumoral, l'activité de l'uridine-kinase est de beaucoup supérieure à celle des tissus normaux ce qui représente un facteur indésirable pour l'action de l'aza 6 - uridine.

Par contre la très faible toxicité pour l'homme de cette substance est un de ses avantages sur les autres cancérostatiques.

Autres effets

L'aza 6 - uridine se comporte comme un immunodépresseur, intéressant à ce titre les greffes d'organes.

A forte dose ce produit provoque chez la Souris gravide une interruption de la gestation. Aux doses thérapeutiques, on n'observe pas d'effet sur la mère, mais des manifestations toxiques se développent chez l'embryon, cet effet étant maximal 10 à 15 jours après la fécondation. S'il survit, le nouveau-né est normal et sa reproductibilité est normale. La prise de fortes doses en fin de gestation provoque la mort du nouveau-né peu de temps après la naissance.

EFFET virustatique

L'effet virustatique a été particulièrement étudié par TAMM et coll (222-223). RADA, BLAŠKOVIĆ et coll (182) ont étudié l'action de l'aza 6 - uridine sur le virus vaccinal à la fois sur membrane chorioallantoïdienne et sur fibroblastes d'embryon de Poulet, par la méthode des cylindres. Ils ont ainsi montré la très faible toxicité de l'aza 6 - uridine comparée à celle du benzimidazole par exemple (dans le rapport de concentration de 3 à 14). Ils n'ont noté aucune activité virulicide vis à vis de la vaccine et aucune activité virulicide vis à vis du virus de la maladie de Newcastle, du virus de l'influenza A souche PR8, ni du virus de l'Encéphalite Equine de l'EST.

L'action de l'aza 6 - uridine serait potentialisée par l'addition d'uréthane (116).

ESSAIS REALISES

Virus à ARN

Nous n'avons obtenu aucun résultat avec le virus Sindbis : ni effet virustatique, ni effet virulicide même à dose élevée (Img/ml)

Virus à ADN

L'aza 6 - uridine s'est révélée active sur le virus de la vaccine. En utilisant la méthode des gradients de concentration l'activité limite trouvée est de 55 µg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE et VIRUSTATIQUE

Virus vaccinal

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
			5000 µg	11	302	74
14	136	94	1000 µg	147	266	65
162	18	14,5	500 µg	154	259	63
166	24	12,5	250 µg			
			100 µg	173	240	58,5
171	29	9,5	50 µg			
180	10		25 µg			

La méthode des cylindres ne nous a donné aucune zone d'inhibition avec une dose de 4 mg sous un volume de 0,2 ml.

Après construction des graphiques correspondants nous obtenons le tableau suivant :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	néant			1,05 mg	0,75 mg	25 µg
Activité virustatique	néant			7,8 mg	50 µg	
Activité limite						
gradient	néant			55 µg/ml		
cylindre	néant			néant		

AZA 6 - CYTIDINE

Si l'aza 6 - cytosine est particulièrement instable, son ribonucléoside, l'aza 6 - cytidine est stable et peut s'obtenir facilement à partir de l'aza 6 - uridine par fermentation.

Normalement l'aza 6 - cytidine est métabolisée en aza 6 - uridine. Chez une souris qui a reçu de l'aza 6 - cytidine en injection intrapéritonéale, on en retrouve 60 % dans l'urine sous forme d'aza 6 - uridine. La voie normale est donc une désamination. Dans les cellules tumorales (tumeur ascitique d'EHRLICH) on retrouve par contre de l'aza 6 - cytidine 5' phosphate et pas du du tout d'aza 6 - uridine 5'-phosphate (94). L'aza 6 - cytidine 5' phosphate semble agir comme un inhibiteur de la décarboxylase de l'acide orotidylique, ce qui empêche la formation d'uridine 5'-phosphate à partir de l'acide orotidylique (211).

ESSAIS REALISES

Virus à ARN

Comme avec l'aza 6 - uridine nous n'avons obtenu aucune différence significative entre les cultures témoins et les cultures additionnées de aza 6 - cytidine, même à des doses élevées, vis à vis du virus Sindbis.

Virus à ADN

L'aza 6 - cytidine possède une activité comparable à celle de l'aza 6 - uridine, mais légèrement plus faible.

Sur le virus vaccinal par la méthode des gradients de concentration l'activité limite déterminée est de 63 µg/ml.

VIRUS VACCINAL

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	5000 µg	158	255	62
25	33	57	1000 µg	172	251	60,5
31	24	11,5	500 µg	206	207	50
53	5	5,5	250 µg	-	-	-
-	-	-	100 µg	207	206	50
57	0	0	50 µg	-	-	-

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons les résultats suivants, groupés dans le tableau ci-dessous :

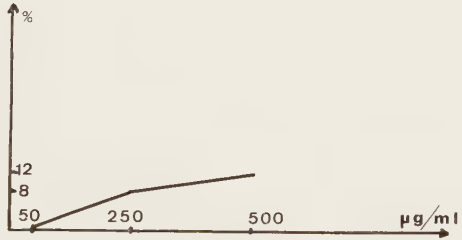
	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	néant			1,6 mg	0,8 mg	0,05 mg
Activité virustatique	néant			0,5 mg		
Activité limite						
gradient	néant			63 µg/ml		
cylindre	néant			0 à 800 µg/ml		

ESSAIS IN OVO

Ni l'azauridine, ni l'azacytidine n'ont montré d'activité virulicide vis à vis du virus de la maladie de NEWCASTLE en oeuf incubé, à des doses variant de 10^{-5} à 5.10^{-3}. Nous n'avons remarqué aucune toxicité dans cet intervalle.

6-AZAURIDINE

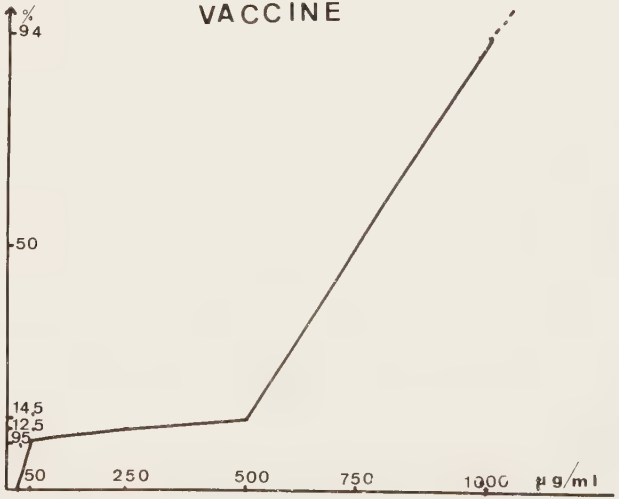
SINDBIS



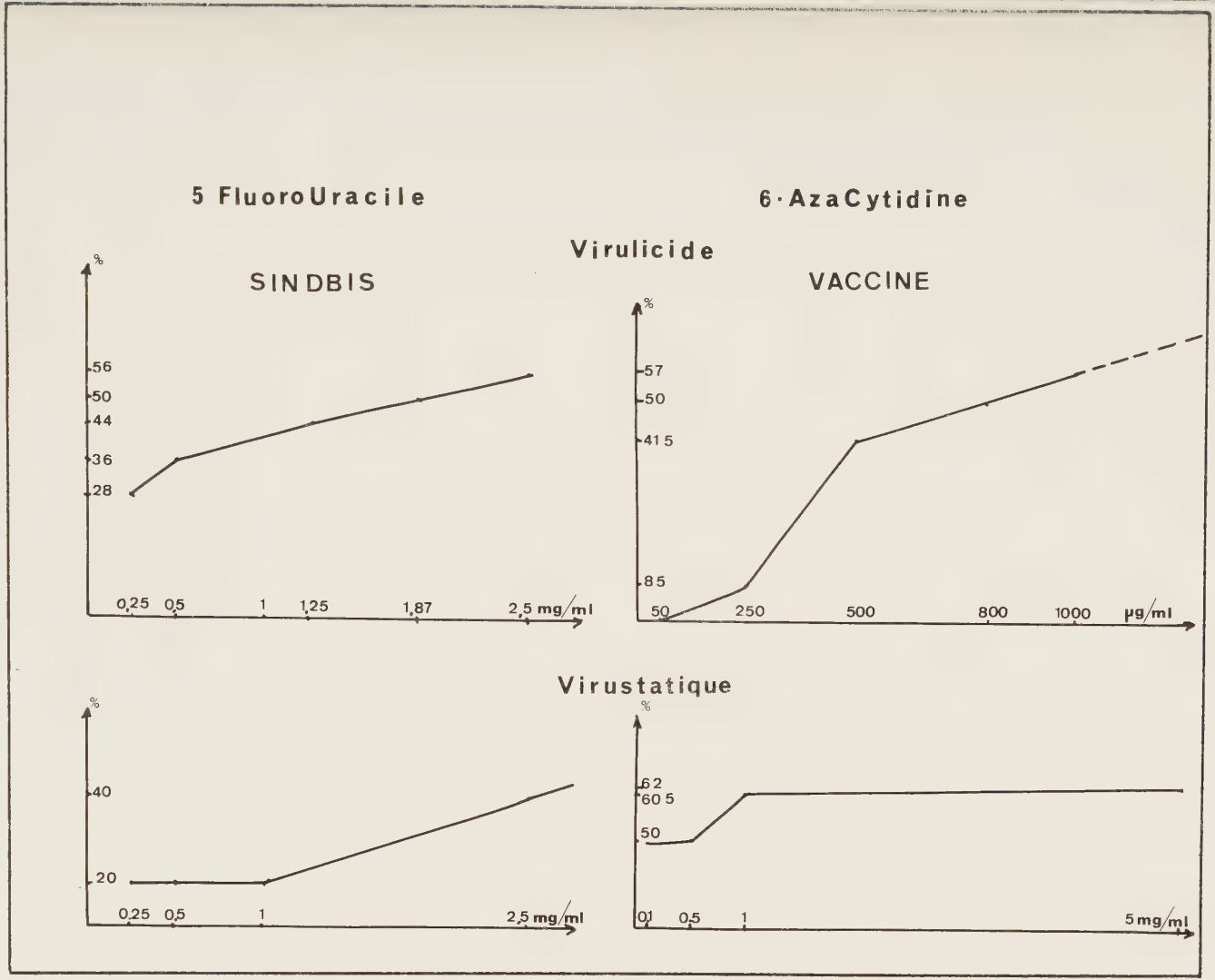
sans activité

VACCINE

Virulicide



Virustatique


5 FluoroUracile
6·AzaCytidine
Virulicide
SINDBIS
VACCINE
%
56
50
44
36
28
0,25 0,5 1 1,25 1,87 2,5 mg/ml
%
57
50
41 5
8 5
50 250 500 800 1000 µg/ml
Virustatique
%
40
20
0,25 0,5 1 2,5 mg/ml
%
62
60 5
50
0,1 0,5 1 5 mg/ml

PYRIMIDINES HALOGENEES.

Nous avons déjà cité les différents dérivés halogénés de l'uracile : Fluoro-5-uracile, Chloro-5-uracile, Bromo-5-uracile. Il faut remarquer tout de suite que l'encombrement stérique du Fluor (rayon de Van der Waals - 0,135 nanomètre) et de l'hydrogène (0,12 nm) sont assez voisins. De ce fait, le Fluoro-5-uracile peut être considéré comme un analogue de l'uracile.

Quant aux dérivés chlorés(rayon de Van der Waals - 0,181 nm), bromés (0.195) et iodés (0.215), ils sont plus proches de la thymine qui porte en 5 un groupement méthyle (rayon - 0,20). Ces dérivés se comporteront donc comme des analogues de la thymine. Ainsi, nous pouvons supposer que le Fluoro-uracile pourra se comporter comme un antimétabolite des virus à ARN (qui contiennent de l'uracile) et les autres dérivés halogénés comme des antimétabolites des virus à ADN (qui contiennent de la thymine) (58).

Effectivement, si nous avons trouvé une très légère action du Fluoro-5-uracile vis à vis du virus Sindbis, nous sommes frappée par la différence d'activité de l'iodo-5-désoxy 2' uridine vis à vis du virus Sindbis et du virus vaccinal. La dose efficace 50 % (D.E. 50) a été estimée d'après nos essais à 6,25 mg/ml pour le virus Sindbis et 1,25 µg/ml pour le virus vaccinal. Dans cet exemple, il faut aussi tenir compte du sucre lié à l'iodo-uracile : il parait évident que le désoxyribose interfère plus facilement avec la synthèse des ADN que le ribose.

Ces deux hypothèses se trouvent confirmées dans le fait que l'iodo-5-uridine ne parait pas très active sur le virus Sindbis, ni sur le virus vaccinal. La substitution iodée oriente l'antimétabolite vers les ADN, mais le sucre étant ici le ribose et non le désoxyribose, l'efficacité de la pyrimidine halogénée ne peut être maximale.

De toutes façons, il est universellement reconnu que les pyrimidines halogénées sont beaucoup moins actives que leurs dérivés ribosylés (180), phénomène que l'on retrouve chez les azapyrimidines.

FLUORO 5 URACILE

Cette substance a été particulièrement étudiée par HEIDELBERGER et ses collaborateurs (99 , 100 , 101 , 102) de même que ses dérivés ribosylés et désoxyribosylés. Ils ont démontré l'inhibition compétitive par ces corps de la thymidylate-kinase, enzyme catalysant la méthylation de l'acide désoxyuridylique en acide thymidylique. Un autre dérivé, la trifluorothymine et son désoxyriboside la trifluorothymidine, agiraient par le même processus à la fois sur les cellules tumorales (100) et sur les virus (126).

IODO 5 DESOXY 2' URIDINE

Ce composé est le plus intéressant de la série et a été très étudié. PRUSOFF (179) en réalisait la synthèse en 1959 et depuis de nombreux auteurs ont décrit ses propriétés antivirales in vitro (108) et in vivo (119 à 126).

Le schéma de l'inhibition compétitive entre la thymidine et l'iododésoxyuridine a été élaboré par PRUSOFF et DELAMORE (54).

La synthèse normale du nucléotide suit les étapes suivantes : la thymidine est phosphorylée en thymidine 5'-phosphate sous l'influence de la thymidine kinase. Puis la thymidylate kinase ajoute un groupement phosphate. Enfin la thymidine-di-phosphokinase ajoutera un troisième groupement phosphate. La DNA polymérase n'aura plus qu'à incorporer ce nucléotide dans la chaîne d'ADN.

L'antimétabolite va suivre la même voie de phosphorylation. Il est prouvé que l'inhibition compétitive par l'antimétabolite intervient au moins à trois niveaux : thymidine kinase, thymidylate kinase, et ADN polymérase. Finalement c'est l'antimétabolite iodouridine 5'-triphosphate qui va se trouver incorporé dans l'ADN.

L'iododésoxyuridine est la première substance qui s'est révélée indiscutablement active dans le traitement d'affections virales (virus à ADN) en particulier dans la kératite herpétique (119 - 120) - 121 - 122 - 123 - 124 - 126), l'encéphalite herpétique et aussi quelques cancers expérimentaux et humains (35).

5-FLUOROURACILE

L'analogue bromé de la substance précédente semble tout aussi intéressant. En effet la dose efficace semble du même ordre, sinon plus faible. De plus, il ne semble pas se développer in vitro de résistance à la bromodésoxyuridine comme c'est le cas avec le dérivé iodé (130). Par contre, in vivo la résistance serait croisée avec l'iododésoxyuridine, mais non avec le cytosine-arabinoside.

ESSAIS REALISES

Nous avons étudié dans cette série quatre dérivés de l'uracile :

- 5-fluorouracile, dérivé halogéné
- 5-iodouridine, dérivé halogéné lié au ribose
- 5-iododésoxy 2' uridine, dérivé halogéné lié au désoxyribose
- 5-bromodésoxy 2' uridine, homologue bromé du dérivé précédent

Ces substances ont été choisies afin de comparer l'effet d'une pyrimidine halogénée à celui d'un riboside et d'un désoxyriboside, et de discerner, si elle existe, une relation entre la structure et l'activité des corps de cette série chimique.

BROMO 5 DESOXY 2' URIDINE

Virus Sindbis

Activité limite (gradient de concentration)

La culture a été recouverte de milieu gélosé à 10 mg/ml :

- à 25 mm, activité limite
- à 30 mm, toxicité cellulaire

Le diamètre des boites utilisées étant de 55 mm, nous avons donc une activité limite à 4,55 mg/ml et une toxicité survenant à 5,45 mg/ml. Il faut remarquer la proximité de la dose active et de la dose toxique, limitant donc l'intérêt thérapeutique de cette substance.

Témoin = 25

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
11	14	56	2,5 mg	15	10	10
14	11	44	1,25 mg	-	-	-
-	-	-	1 mg	20	5	20
16	9	36	0,5 mg	20	5	20
18	7	28	0,25 mg	20	5	20

D'après le graphique construit à l'aide de ces points, nous avons obtenu

	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide in vitro	7,5 mg/ml	1,87 mg/ml	-
Activité virustatique	7 mg/ml	3,25 mg/ml	
Activité limite	4,5 mg/ml		
Disques		néant	
Cylindres		néant	

IODO 5 URIDINE

Activité limite : la toxicité cellulaire apparait à 6 mg/ml.

Virus Sindbis

A la concentration de 1 mg/ml, aucune ligne de suppression des plages ne se manifeste. Cependant il apparaît nettement une zone de petites plages et une zone de plus grosses plages, les premières mesurant environ 1 mm, les autres ayant un diamètre d'au moins 3 mm.

Sur 4 essais, la ligne divisant la boite en deux zones se situait à : 1,25 - 1,35 - 0,95 et 1,05 cm ce qui nous a paru suffisamment constant pour exprimer une activité certaine de l'iodouridine dans le domaine de la

taille des plages plutôt que dans la réduction de leur nombre. Si nous admettons cette activité, difficile à définir il est vrai, nous obtenons une valeur moyenne de : 0,24 mg/ml.

Virus vaccinal

La concentration de la substance dans le milieu gélosé étant de 10 mg/ml, l'activité limite se manifeste à 2,70 cm soit à 5,5 mg/ml.

Les essais de protection et de contact nous ont apporté les résultats suivants :

Virus Sindbis Témoin = 61

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	5 mg	toxicité cellulaire		
26	35	57,5	2,5 mg		-	-
38	23	38	2 mg	86	35	29
59	2	3	1 mg	102	9	15
59	2	3	0,5 mg	104	9	11,5
62	0	0	0,25 mg	113	0	0
86	0	0	0,05 mg			

Virus vaccinal Témoin 321

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
3	318	99	1 mg	-	-	-
16	305	95	0,5 mg	101	220	68
93	228	71	0,2 mg	137	183	57
282	39	12	0,1 mg	147	173	54

Le tableau suivant rassemble ces résultats

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	5,75 mg/ml	1,95	0,25 mg	1,15 mg	0,17 mg	-
Activité virustatique		3,5	1,70 mg	1,70 mg	-	-
Activité limite exprimé par ml	0,24 mg/ml			5,5 mg/ml		

5-IODODESOXY2'URIDINE

Activité limite

Virus Sindbis

Il se produit avec ce dérivé désoxyribosylé le même phénomène qu'avec le dérivé ribosylé c'est à dire qu'aucune ligne de disparition des plages n'apparaît. Par contre on peut repérer une zone de petites plages et une zone de plages plus grosses à la concentration élevée de 500 ou de 1000 µg/ml.

Virus vaccinal

Vis à vis de ce virus, la 5-iododésoxyuridine s'est révélée très active : avec une concentration de 5 µg/ml dans le milieu gélosé nous n'obtenons aucune plage. A 2 µg/ml l'activité limite se manifeste à 1,25 - 1,20 et 1,25 cm ce qui correspond à 0,50 µg/ml. A 1 µg/ml l'activité limite apparaît à 3 et 3,2 cm, soit 0,60 µg/ml.

Activité virulicide et virustatique

Les résultats obtenus sont les suivants, pour un témoin égal à 56 :

Virus Sindbis

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	10 mg	0	0	100
34	22	39	5 mg	0	0	
43	13	23	2,5	-	-	
-	-	-	2	0	0	
48	8	14	1			
51	5	9	0,5			
Virus vaccinal			Témoin - 206			
0	206	100	10 µg	0	206	100
34	172	82	5 µg	30	176	85
73	133	65	2 µg	50	156	76
116	90	44	1 µg	130	76	37

Après construction des graphiques nous obtenons le tableau suivant :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide		6,25 mg/ml		9 µg/ml	1,25 µg/ml	
Activité virustatique	1 mg/ml			10 µg/ml	1,25 µg	
Activité limite					0,60 µg/ml	
Cylindres 100 g					3,05 cm	

CYLINDRES : Sur une culture de virus vaccinal, en déposant sous un volume de 0,20 ml, 200, 100, 50 et 25 ug de solution d'iododésoxyuridine, nous avons obtenu les zones d'inhibition suivantes (diamètre de la zone d'inhibition)

200 µg : 4,15 cm

100 µg : 3,05 cm

50 µg : 2,10 cm

25 µg : 1,60 cm

BROMO5DESOXY 2' URIDINE

ACTIVITE LIMITE

VIRUS SINDBIS

Nous n'avons décelé aucune inhibition des plages de virus Sindbis, même à une dose de 10 mg/ml.

VIRUS VACCINAL

Le virus vaccinal semble très sensible à la bromo désoxy-uridine :

Avec une concentration de 10 µg/ml, et même de 5 µg/ml, il ne se forme aucune plage.

Avec une concentration de 2,5 µg/ml, la ligne d'inhibition se manifest à 3,7 cm, ce qui correspond à une activité limite de 1,90 µg/ml

ACTIVITES VIRULICIDES ET VIRUSTATIQUES

VIRUS SINDBIS

L'activité semble inégale avec ce virus, et particulièrement sensible à l'importance de l'inoculum viral.

Témoin = 66

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	5 mg	10	26	39
70	0	0	2,5 mg		-	-
-	-	-	2	35	31	47
64	2	3	1 mg	42	24	36
62	4	6	0,5 mg	41	25	38
57	9	13,5	0,25mg	-	-	-

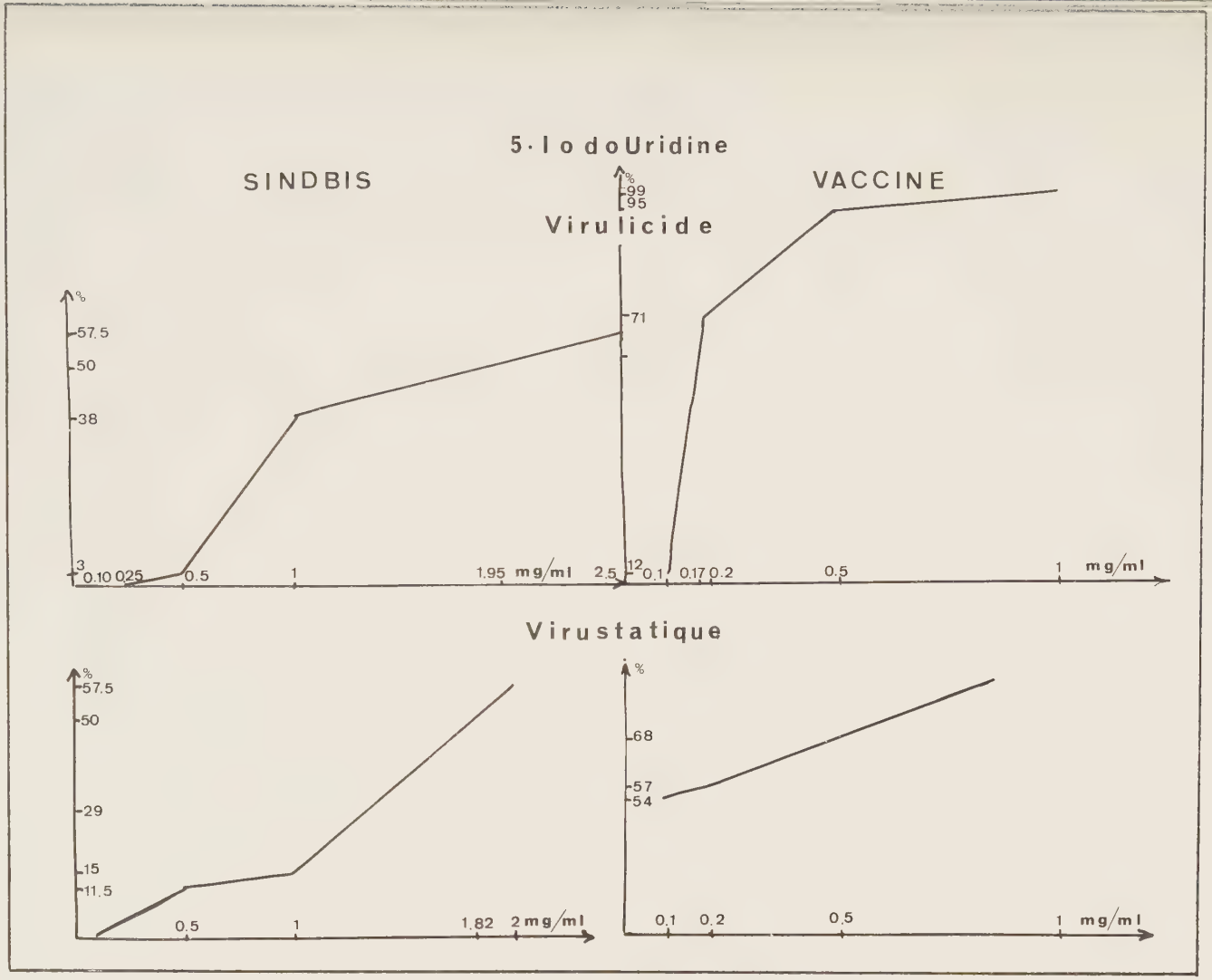
Nous pouvons donc considérer ce produit comme inactif sur le virus Sindbis.

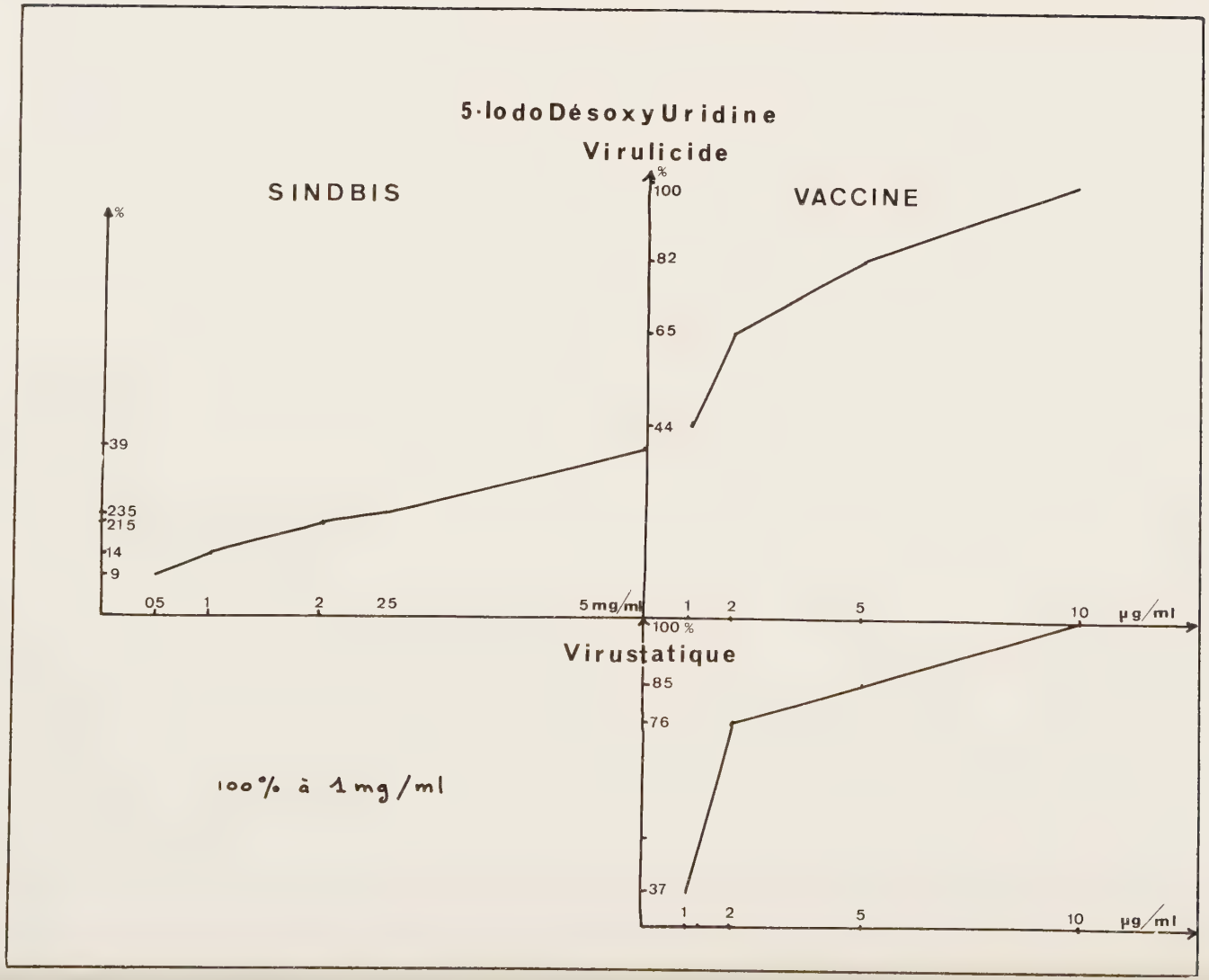
VIRUS VACCINAL

Témoin = 321

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		M	T - m	%
0	321	100	5 µg	1	320	100
21	300	93	2 µg	12	309	98
97	224	66	1 µg	93	228	71
135	186	58	0,5 µg	104	217	67

D'autres essais nous ont montré que l'effet virustatique seul est encore marqué à des doses de l'ordre de 0,1 µg/ml.


5-IodoUridine
SINDBIS
VACCINE
Virulicide
%
99
95
71
57.5
50
38
3
0.10 0.25 0.5 1 1.95 mg/ml 2.5
12
0.1 0.17 0.2 0.5 1 mg/ml
Virustatique
%
57.5
50
29
15
11.5
0.5 1 1.82 2 mg/ml
%
68
57
54
0.1 0.2 0.5 1 mg/ml


5-IodoDésoxyUridine
Virulicide
SINDBIS
VACCINE
%
100
82
65
44
39
235
215
14
9
05
1
2
25
5 mg/ml
1
2
5
10
µg/ml
100 %
Virustatique
85
76
37
1
2
5
10
µg/ml
100% à 1 mg/ml

LES ARABINOSIDES.

Depuis leur découverte par BERGMANN (14), les arabinosides ont été synthétisés. TODD; le premier, synthétisa de l'uracile arabinoside (26), puis FOX (78) le thymine arabinoside, HUNTER (114) le cytosine arabinoside. On dispose maintenant aussi d'adénine arabinoside et de guanine arabinoside.

L'activité antitumorale du cytosine arabinoside chez l'animal (73, 74) s'est montrée varaible selon l'espèce. Son activité antitumorale chez l'homme paraît transitoire mais objective (106, 142, 159, 218).

ACTIVITE ANTIVIRALE

IN VITRO

RENIS et JOHNSON (191), BUTHALA (33), UNDERWOOD (236), de RUDDER et PRIVAT de GARILHE (57, 58, 175), ont particulièrement étudié l'action du cytosine arabinoside.

La plupart des auteurs s'accordent à ne reconnaître aucune activité sur les virus à ARN au cytosine arabinoside, à l'exception de EIDINOFF et coll. (69), qui inhibent la multiplication du virus du sarcome de ROUS sur culture d'embryon de Poulet, à la dose de 2 µg/ml.

Par contre le thymine arabinoside, le cytosine arabinoside et l'adénine arabinoside, sont actifs sur deux grands groupes de virus à ADN : Herpès-virus et pox-virus. Les 5 halogénouracile arabinosides ont montré une activité du même ordre que celle de leurs dérivés désoxyribosylés.

IN VIVO

ESSAIS SUR L'ANIMAL

Le cytosine arabinoside est le plus étudié de cette série. Il a été essayé surtout dans les kératites herpétiques et vaccinales expérimentales du Lapin (236, 237, 238).

Il est nécessiare, pour obtenir un résultat, d'appliquer fréquemment la

substance (toutes les heures pendant les 48 heures suivant l'infection) à la dose de 50 mg chaque fois.

L'absence de résistance croisée avec l'iododésoxyuridine remarquée in vitro est confirmée in vivo.

ESSAIS SUR L'HOMME .

KAUFFMANN (121, 125, 126) a confirmé l'efficacité de cette substance dans la kératite herpétique humaine et ses multiples avantages sur l'iododésoxyuridine : solubilité plus grande, donc administration moins fréquente et absence de résistance, ou tout au moins apparition très lente de la résistance des virus herpétiques, toxicité très faible (DL 50 supérieure à 1 g/kg pour le Rat et la Souris (73, 74).)

MECANISME D'ACTION

Le mécanisme d'action des arabinosides est du même type que celui des pyrimidines halogénées. En effet, ces substances se comportent comme inhibiteurs compétitifs des enzymes permettant la phosphorylation puis la polymérisation des nucléosides.

Le cytosine arabinoside en particulier, voit son pouvoir inhibiteur levé par la cytidine et par la 5 méthyl 2' désoxycytidine.

CHU et FISHER (43) ont montré que cette drogue empêche la réduction du cytidine 5' diphosphate (C R 5' PP ou CDP) endésoxycytidine 5' diphosphate (C d R5' PP). L'absence de résistance croisée avec les pyrimidines halogénées, montre que ni la Thymidylate-synthétase ni la Thymidylate-kinase ne sont touchées.

Comme autre site d'action possible, KAUFFMANN (124), CHU et FISHER (43) envisagent les kinases phosphorylant la désoxycytidine, tandis que CARDEILHAC & COHEN (37) montrent que l'inhibition compétitive du cytidine arabinoside ne pouvait se produire au niveau de l'ADN -polymérase, puisque cette substance n'est jamais incorporée dans l'ADN.

Il semble intéressant de noter que les arabinosides se comportent parfois comme des analogues du ribose, parfois comme des analogues du désoxyribose parmi les purines arabinosides, comme des analogues du désoxyribose pour les pyrimidines arabinosides, au niveau de la phosphorylation et de la polymérisation des nucléotides.

ESSAIS REALISES AVEC LE CYTOSINE ARABINOSIDE

ACTIVITE LIMITE

La toxicité cellulaire n'a pu être déterminée malgré l'emploi de doses fortes (10 mg/ml).

VIRUS SINDBIS

Aucune activité n'a pu être décelée : les plages sont uniformément réparties dans la boite, même avec une concentration maximale de 10 mg/ml.

VIRUS VACCINAL

La sensibilité de ce virus au cytosine arabinoside parait très grande : à 20 µg/ml, nous n'avons obtenu aucune plage. La grande solubilité et la grande diffusibilité de C.A. jouent certainement un rôle dans ce phénomène.

Avec une concentration maximale de 5 µg/ml l'activité limite se manifeste à 1,45 cm, c'est à dire pour une dose de 148 µg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

VIRUS SINDBIS

Nous n'avons décelé aucune activité intéressante vis à vis de ce virus : les résultats obtenus sont irréguliers et ne dépassent en aucun cas 17 ou 18 % d'effet antiviral.

VIRUS VACCINAL

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
0	-	-	10 µg	0	-	-
0	-	-	5 µg	1	412	100
31	382	93	2 µg	56	357	87
158	255	62	1 µg	126	287	70
140	216	61	1 µg	121	235	68
184	172	48	0,5 µg	140	216	61
328	28	8	0,25 µg	111	215	60

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons le tableau suivant :

	SINDBIS	VACCINE		
		100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	néant	2,2 µg/ml	0,6 µg/ml	10,2 µg/ml
Activité virustatique	néant	5 g/ml		-
gradient	néant			
Activité limite	néant			
cylindres	néant			

ESSAIS IN OVO

ACTIVITE VIRUSTATIQUE SUR LE VIRUS VACCINAL

Trois groupes d'oeufs ont reçu trois doses différentes de Cytosine-arabinoside répétées à 24 heures d'intervalle pendant 5 jours. Puis tous ont reçu environ 10 particules infectantes de vaccine. Trois jours plus tard les pustules sont dénombrées sur les membranes chorio-allantoïques.

Dose	1er jour	2ème jour	Nombre de pustules	Moyenne
1 µg	9v, 1+	9v , 1+	1-17-35-31-18-36-7-7-16	18
5 µg	9v, 1+	9v , 1+	10-30-13-12-24-7-3-7-10	12
10 µg	7v, 3+	7v , 3+	2-2-8-9-25	9
T	10v	10v	2-10-43-11-1-1-14-2-19-13	12

Nous voyons ici apparaitre une certaine activité du cytosine-arabinoside vis à vis du virus vaccinal chez l'oeuf incubé. Pour une dose de 10 µg cette activité peut s'évaluer à 25 % ; elle est nulle à la dose de 5 µg.

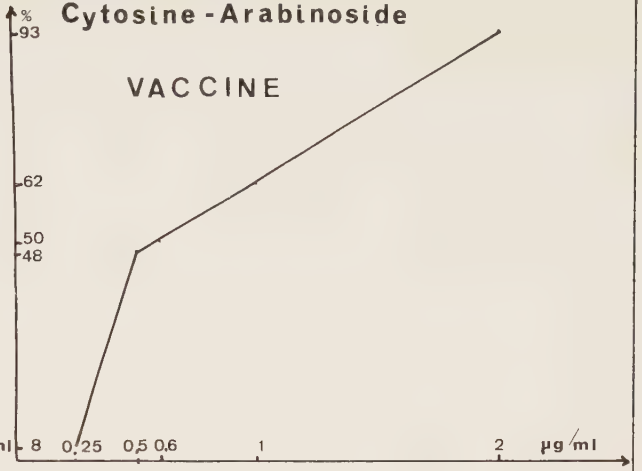
Virulicide

5· BromoDésoxyUridine

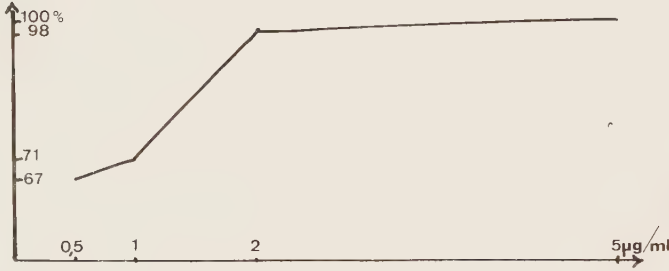
VACCINE

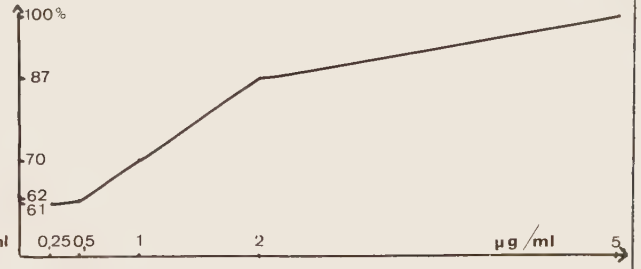
Cytosine-Arabinoside

VACCINE



Virustatique





INHIBITEURS DES ACIDES NUCLEIQUES

AUTRES QUE LES ANTIMETABOLITES

A - DERIVES DU BENZIMIDAZOLE

FC 10

FC 11

FC 44

FC 47

FC 144

FC 243

B - DERIVES DE LA GUANIDINE

A. B. O. B.

C - L'AMANTADINE

INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES AUTRES QUE LES ANTIMETABOLITES

A) Les dérivés du BENZIMIDAZOLE

Cette série chimique a été particulièrement étudiée par TAMM et ses collaborateurs (220, 221, 222, 223, 224). Dès 1954, (220) TAMM notait l'action du benzimidazole et de ses dérivés sur le virus de l'influenza B. L'activité des dérivés du benzimidazole permet de les diviser schématiquement en deux groupes :

- ceux qui inhibent la multiplication virale et
- ceux qui favorisent la multiplication virale.

Cette division n'est pas aussi simple qu'il paraît à première vue ; en effet il ne faut pas oublier lorsqu'on étudie l'activité antivirale d'une substance que l'on s'adresse à un virus donné, parasitant une cellule-hôte donnée dans certaines conditions. Les effets de la substance peuvent être tout à fait différents si l'on choisit un autre virus, ou un autre système cellulaire hôte ou des conditions de croissance différentes. Ce phénomène est particulièrement frappant dans l'étude des dérivés du benzimidazole. On comprend facilement que les virus à ARN et les virus à ADN ne présentent pas la même sensibilité à une même substance. Ici les différences s'observent même à l'intérieur de l'embranchement des ribovirus et de l'embranchement des désoxyribovirus, et les différents auteurs rapportent des résultats très variables selon les systèmes utilisés.

Ainsi BUCKNALL (30) prouve que les virus de l'influenza et parainfluenza sont plus sensibles aux dérivés du benzimidazole (4, 5, 6 trichloro 1 D ribofuranosyl benzimidazole ou T. R. B. et 2-mercapto 1 (4 pyridéthyl) benzimidazole ou M. P. B.) que le virus de l'encéphalomyocardite par exemple. Au contraire WALTERS (240) et coll. ont observé une stimulation de la multiplication des virus du parainfluenza avec les mêmes dérivés T. R. B. et M. P. B. Sans doute, comme l'observe BUCKNALL s'agit-il ici d'une différence due au système cellulaire hôte.

D'autre part, dans le même système cellulaire hôte, les virus d'une même famille semblent réagir de façons sinon semblables au moins voisines. WALTERS, BURKE et SKEHEL (249) montrent une analogie de comportement vis à vis des mêmes dérivés du benzimidazole : Semliki et Chikungunya, virus de la maladie de Nexcastle et virus du parainfluenza de la Peste aviaire et myxovirus influenza.

Certains caractères généraux peuvent malgré tout être établis :

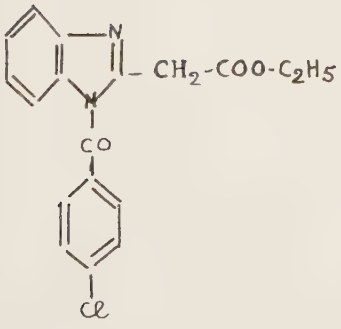
- Le benzimidazole et son dérivé hydroxylé sont très toxiques (183). C'est pourquoi la recherche d'un dérivé moins toxique mais aussi actif présente beaucoup d'intérêt.
- De même que la ribosylation ou la désoxyribosylation des bases hétérocycliques les rend plus actives, de même les dérivés ribosylés ou glucosés du benzimidazole semblent être plus actifs. (223, 224)
- En utilisant un même système cellulaire hôte il est possible de rencontrer, suivant les dérivés étudiés sur un même virus, soit une inhibition soit une augmentation de la multiplication virale. (221, 222)

ESSAIS REALISES AVEC LES DERIVES DU BENZIMIDAZOLE

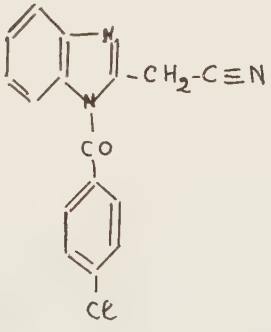
Nous avons retrouvé, comme beaucoup d'auteurs, la même disparité des résultats avec les différents dérivés étudiés sur les systèmes virus-hôtes utilisés dans ce travail.

Nous avons étudié dans cette série les corps portant les numéros de code suivant : F.C. 10, F.C. 11, F.C. 44, F.C. 47, F.C. 144 et F.C. 243 dont les formules sont représentées dans le tableau ci-dessous.

F. C. 10

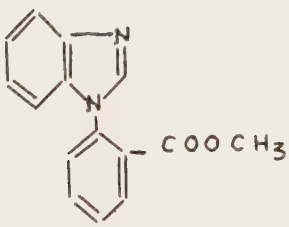


F. C. 11



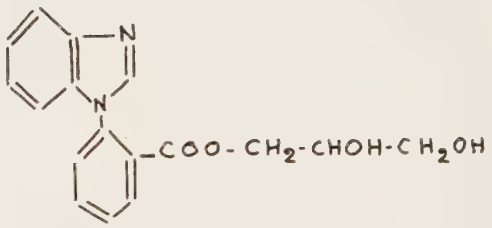
La série des F.C. nous a été confié par : C.B.R.A.
60, route de Noisy - 93 - Romainville

F. C. 44



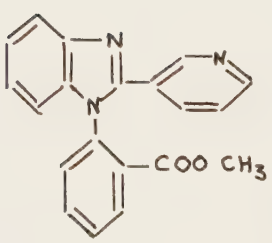
O. Carbométhoxy-phénil - 1
benzimidarole

F. C. 47



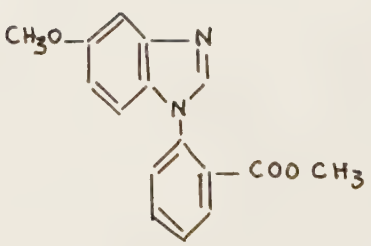
(Dihydroxy , propiocarbonyl) 2'
phényl - 1 - benzimidarole

F. C. 144



O. Carbométhoxy-phényl-1
pyridyl - 2 - benzimidarole

F. C. 243



O. Carbomethaxy-phényl-1
methoxy - 5 - benzimidarole

F.C. 10 et F.C. 11 se sont révélés actifs sur le virus Sindbis à des concentrations cependant voisines de leur toxicité vis à vis des cellules d'embryon de Poulet.

F.C. 44 et F.C. 47 favorisent au contraire la multiplication du virus Sindbis dans les mêms cellules. Par contre leur activité vis à vis du virus vaccinal ne fait aucun doute, surtout comme virulicide. Mais la toxicité de ces composés n'est pas négligeable.

F.C. 144 et F.C. 243 semblent beaucoup moins toxiques (pas de toxicité à 10 mg/ml). Le seuil d'activité est plus élevé mais il est du même ordre pour le virus Sindbis et pour le virus vaccinal.

Nous avons donc ici trois groupes de produits :

- certains très actifs et très toxiques : F.C. 10 et F.C. 11
- d'autres dont l'activité est dissociée selon le virus en cause : F.C. 44 et F.C. 47
- d'autres moins actifs mais aussi beaucoup moins toxiques.

Tous les essais ont été réalisés en solubilisant les produits de cette série dans du diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.). La solution a été ensuite diluée dans le tampon habituel de telle façon que la concentration finale de D.M.S.O. dans le milieu soit proche de 1 pour 1000. Les témoins ont été traités avec la même concentration de D.M.S.O.

ACTIVITE LIMITE

Virus SINDBIS

F.C. 10 Avec une concentration maximale de 2 mg/ml dans la gélose de surface, nous avons obtenu les résultats suivants : toxicité à 1,65 - 1,3 et 1,6 et 1,35 (m = 1,32) et l'activité limite à 1,15 - 0,97 - 0,5 - 0,95 (m = 0,76) ce qui porte la toxicité à 0,55 mg/ml et l'activité à 0,32 mg/ml.

F.C. 11 Avec une concentration maximale de 500 ug par ml de gélose de surface, nous avons obtenu la ligne de toxicité à 2,55 - 2,4 - 2,25 (m = 2,4) et la ligne d'activité à 2,10 - 1,6 - 0,90 (m = 1,55) Cela revient donc à une toxicité de 0,25 mg/ml et une activité de 157 µg/ml.

F.C. 44 et F.C. 47 Nous n'avons observé aucune activité avec la méthode utilisée sur le virus Sindbis.

F.C. 144 Avec une concentration maximale de 1 mg/ml dans la gélose de surface, nous obtenons une limite d'activité à 3,10 cm - 3 cm et 3,15 cm, c'est à dire à 615 µg/ml.

F.C. 243 Avec une concentration maximale de 10 µg/ml nous n'obtenons pas d'activité limite, mais une diminution du nombre et de la taille des plages qui restent cependant réparties de façon homogène. Aucune toxicité ne se manifeste à 10 mg/ml pour le F.C. 144 et le F.C. 243.

Virus VACCINAL

F.C. 44 Avec une concentration maximale de 1 mg/ml la limite d'activité se manifeste à 1,8 - 1,7 et 1,7 cm ce qui correspond à une dose de 0,36 mg/ml.

F.C. 47 Avec une concentration maximale de 1 mg/ml la limite d'activité est obtenue à 2,4 cm soit pour une dose de 0,49 mg/ml

F.C. 144 Avec une concentration maximale de 1 mg/ml dans la gélose de surface, nous obtenons une activité limite à 3,3 - 3,3 et 3,3 cm , c'est à dire à 0,67 mg/ml.

F.C. 243 Avec une concentration maximale de 10 mg/ml nous obtenons l'activité limite à 3,5 et 3,7 cm, c'est à dire pour une dose de 7,35 mg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

VIRUS SINDBIS

F.C. 10 Témoin = 57

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	5 mg	0	57	100
09	48	100	1 mg	9	48	82
9	48	82	500 mg	20	37	65
39	18	31	200 µg	30	27	48
46	11	19	100 µg	34	23	41

F.C. 11 Témoin - 70

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
8	62	88,5	100 µg	31	39	56
20	50	71,5	50 µg	32	38	54
25	45	64	25 µg	37	33	42,5
33	37	53	12 µg	-	-	-

F.C. 44 Témoin 30

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	$\frac{mx\ 100}{T}$		m	T - m	$\frac{T - M \times 100}{T}$
-	-	-	500 µg	27	3	10 %
42	-12	140 %	250 µg	-	-	-
-	-	-	200	35	-5	-16 %
47	-17	156 %	100 -	27	3	10 %
49	-19	164 %	50 -	28	2	6,6 %
41	-11	137 %	25 -	-	-	-

Dans ce tableau nous avons appelé $\frac{mx\ 100}{T}$ l'effet comparé au témoin rapporté à 100 .

C'est donc l'augmentation du nombre de plages qui figure dans cette colonne.

Nous avons appelé $\frac{T - M}{T} \times 100$ le calcul habituel ramenant à l'activité pour 100 plages T de culture témoin.

(On retrouvera les mêmes dénominations dans le tableau suivant).

F. C. 47

Témoin = 37

Activité virulicide			Dose	Activité virustatique		
m	T - m	$\frac{m \times 100}{T}$	par ml	m	T - m	$\frac{T - M}{T} \times 100$
-	-	-	500 µg	12	25	67 %
48	-11	130 %	250 µg	-	-	-
-	-	-	200 µg	13	26	67 %
41	-4	110 %	100 µg	13	26	67 %
37	0	100 %	50 µg	13	26	67 %
31	6	-16 %	25 µg	-	-	-

Ici encore on assiste à l'augmentation du nombre des plages par rapport au témoin dans la mesure d'activité par contact. Seule la dose de 25 µg/ml montre une légère activité virulicide. L'effet virustatique est identique quelle que soit la dose utilisée entre 50 et 500 µg/ml.

F. C. 144

Témoin = 85

Activité virulicide			Dose	Activité virustatique		
m	T - m	%	par ml	m	T - m	%
	toxique		1 mg		toxique	
7	78	90	0,5 mg	9	76	88
55	30	35	0,2 mg	26	59	70
68	17	20	0,1 mg	34	51	60

F. C. 243

Témoin = 40

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
46	- 6	0	5 mg	4	36	90
48	- 8	0	2 mg	4	36	90
36	4	0	1 mg	10	30	75
37	3	0	0,5 mg	13	27	65

La lecture de ce tableau montre que l'activité virulicide du F. C. 243 peût être considérée comme nulle, car les écarts avec le témoin paraissent trop faibles (inférieur à 20 %) pour être significatifs, dans un sens comme dans l'autre.

VIRUS VACCINAL

F. C. 10

Témoin = 490

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
0	490	100	5 mg	0	490	100
0	490	100	1 mg	89	401	82
129	361	72	0,5 mg	136	354	72,5
265	225	46	0,2 mg	210	280	57
431	59	12	0,1 mg	234	176	36

Il faut noter en même temps que la réduction du nombre de plages s'accompagne d'une diminution sensible du diamètre des plages : au dessus de 200 µg/ml, elles ont la taille d'une tête d'épingle. A 100 µg/ml, les plages sont normales, semblables à celles de la boite témoin.

F. C. 11 Témoin = 200

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
106	94	47	200 g	84	116	58
136	64	32	100 "	125	75	37, 5
194	6	3	50 "	147	53	36, 5
200	0	0	20 "	150	50	25

A la dose de 200 µg/ml, il se manifeste une légère toxicité cellulaire.

F. C. 44 Témoin = 100

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	500 µg	15	85	85
53	47	47	250 µg	-	-	-
-	-	-	200 µg	24	76	76
-	-	-	100 µg	33	67	67
80	20	20	50 µg	45	55	55
102	0	0	25 µg	-	-	-

F. C. 47 Témoin = 253

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	500 µg	101	152	60
177	76	30	250 µg	-	-	-
-	-	-	200 µg	101	152	60
210	43	17	100 µg	96	157	62
249	4	1	50 µg	-	-	-
255	0	0	25 µg	-	-	-

F.C. 144

Témoin = 415

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
très légère toxicité			100 µg	très légère toxicité		
90	325	78	50 µg	81	334	80
143	272	65	20 µg	100	315	76
136	279	66	10 µg	166	249	60

F.C. 243

Témoin = 272

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
0	272	100	5 mg	0	272	100
52	220	80	2 mg	75	197	72
62	210	72	1 mg	93	179	65
106	166	61	0,5 mg	110	162	60

Les plages obtenues avec les essais de contact et les essais de protection à la dose de 2 mg étaint particulièrement petites (de la taille d'une pointe d'épingle). Dans les autres doses, les plages étaient de taille et de forme normale.

Après construction des graphiques correspondants à chacun de ces produits, on obtient les résultats que nous avons groupés dans le tableau ci-dessous.

SINDBIS					
	Activité virulicide			Activité virustatique		Activité limite
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
(activité exprimée par ml)						
F. C. 10	1mg	0,15mg		2,05mg	0,07mg	0,32mg
F. C. 11	130µg	7,5µg				157µg
F. C. 44	nég (nbre de plages aug)			néant		néant
F. C. 47	67 % de protection quelle que soit la dose entre 50 et 500 g					néant
F. C. 144	0,55mg	0,27mg		0,7mg		0,61 mg
F. C. 243	90 % à 2 mg/ml			rien à 5 mg/ml		rien à 10 mg

VACCINE						
F. C. 10	1mg	0,15mg	-	1,75mg	-	-
F. C. 44	630µg	275µg	25µg	250µg	25µg	360µg
F. C. 47	-	455µg	50 g	60 % de 100 à 500µg		490µg
F. C. 144	550µg	275µg	-	700µg	100µg	670µg
F. C. 243	5mg	0,1mg	-	5mg		7,35µmg

CONCLUSION

F.C. 10 et F.C. 11

F.C. 11 étant une forme soluble de F.C. 10 il n'est pas surprenant de leur voir développer une activité semblable. Par ailleurs la capacité de diffusion de la substance étudiée soit dans les cellules soit dans la gélose, étant une des conditions essentielles pour la réalisation de nos techniques, il est normal de voir attribuer au F.C. 11 une activité double de celle de F.C. 10.

F.C. 44 et F.C. 47

Ces composés ne diffèrent que par leur chaîne latérale en 2' et présentent tous deux cette dissociation d'effet sur les virus à ARN et ADN. Ils favorisent les premiers et inhibent la multiplication des seconds.

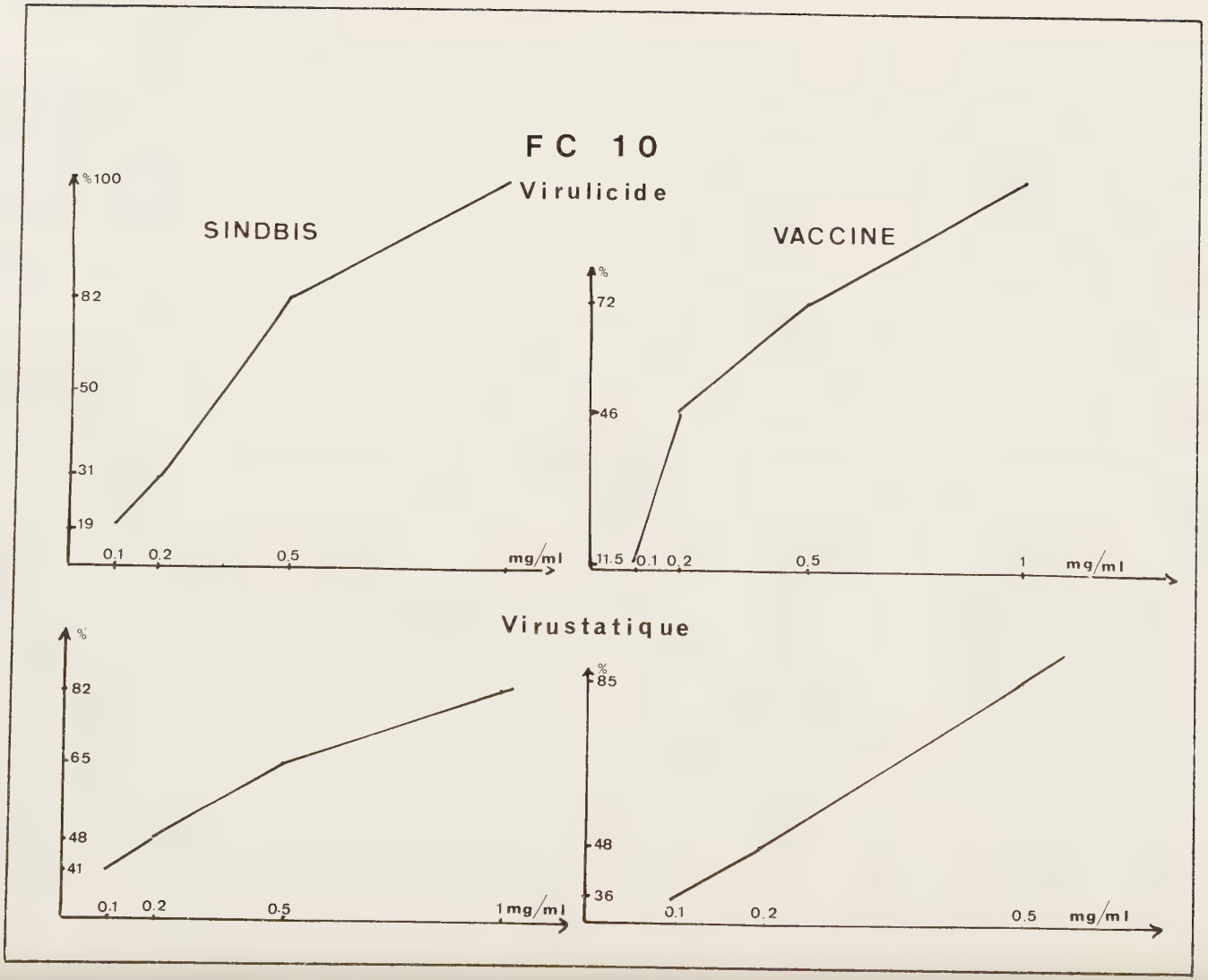
Il est curieux de constater que l'addition d'un radical pyridyl sur le carbone 2 du F.C. 44 (voir structure du F.C. 144) inverse totalement l'action du produit sur le virus à ARN puisque F.C. 144 est au contraire actif tant du point de vue virulicide que virustatique sur le virus Sindbis et sur le virus vaccinal.

F.C. 243

Ce composé possède une activité intermédiaire entre les deux actions précédentes il est en effet actif sur le virus vaccinal mais pratiquement dépourvu d'activité sur le virus Sindbis.

IN OVO

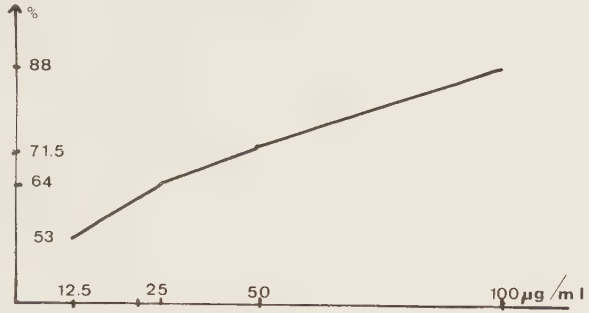
L'activité virulicide de FC 11, FC 47, FC 144 a été essayée à des doses comprises entre 10 µg/ml et 1000 µg/ml. Ces substances n'ont manifesté, à ces doses aucune toxicité chez l'oeuf incubé, ni aucune activité vis à vis du virus de la maladie de NEWCASTLE.


FC 10
Virulicide
SINDBIS
%100
82
50
31
19
0,1
0,2
0,5
mg/ml
VACCINE
%
72
46
11,5
0,1
0,2
0,5
1
mg/ml
Virustatique
%
82
65
48
41
0,1
0,2
0,5
1 mg/ml
%
85
48
36
0,1
0,2
0,5
mg/ml

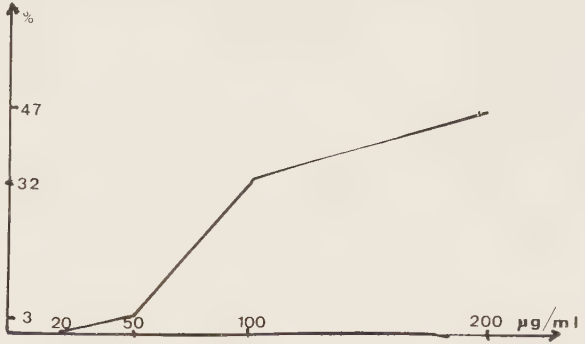
FC 11

Virulicide

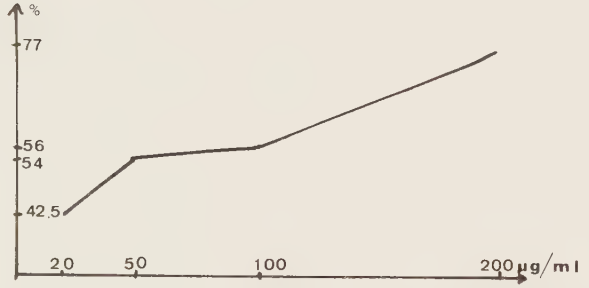
SINDBIS

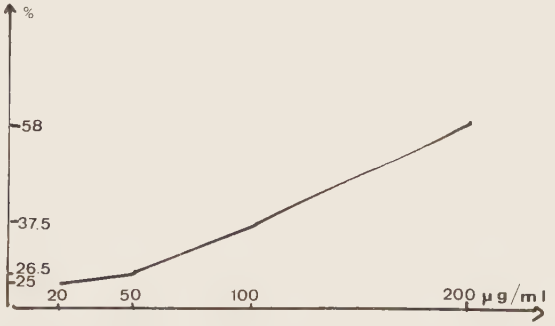


VACCINE



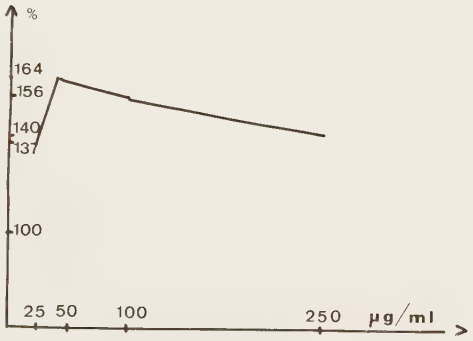
Virustatique





FC 44

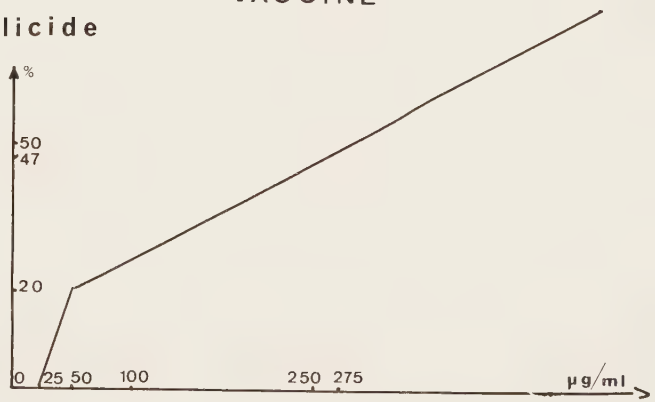
SINDBIS



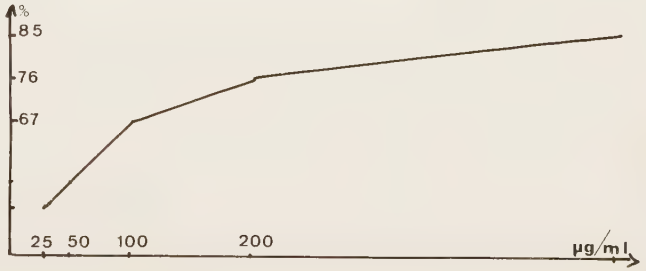
sans activité

VACCINE

Virulicide

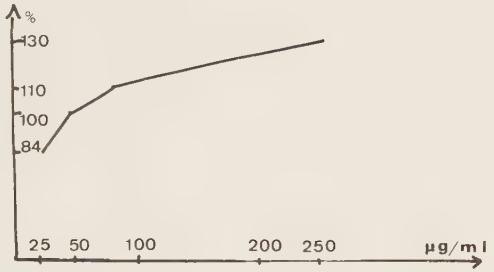


Virustatique



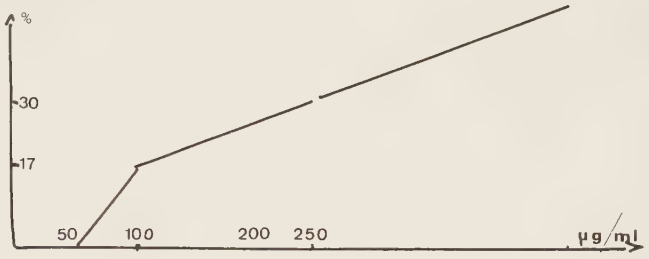
FC 47

SINDBIS

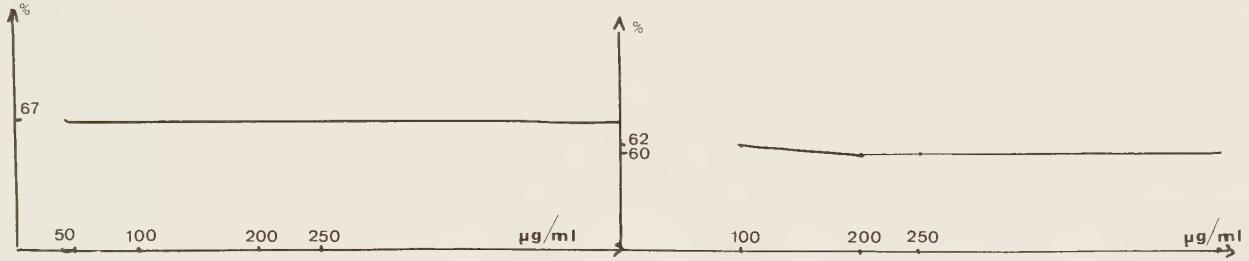


VACCINE

Virulicide



Virustatique

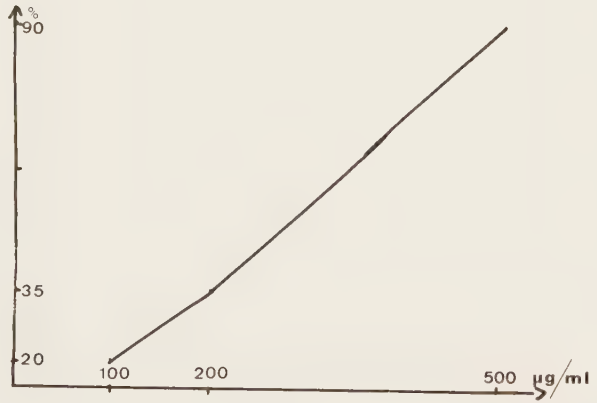


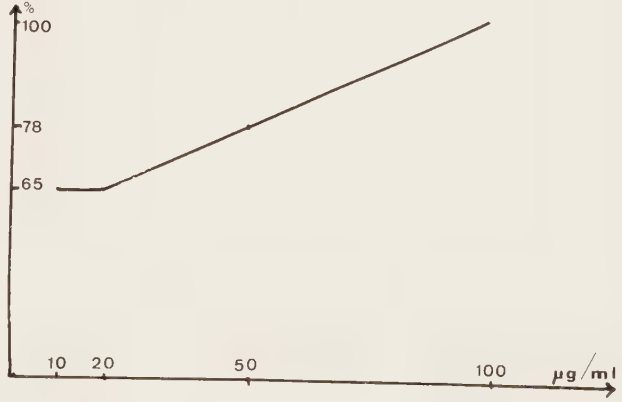
FC 144

SINDBIS

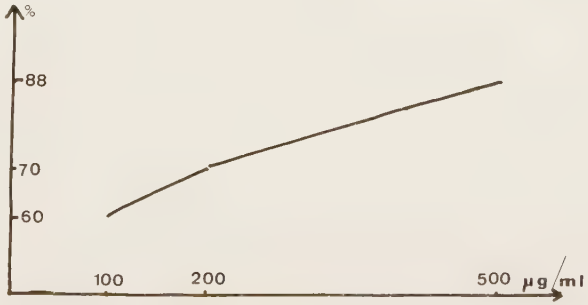
VACCINE

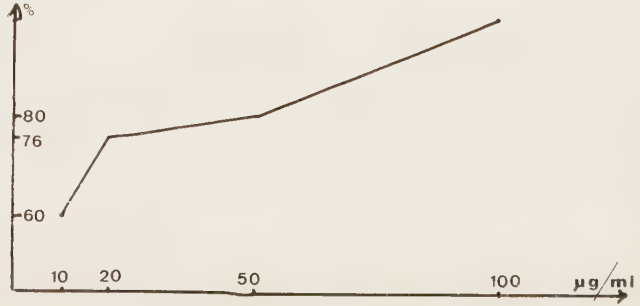
Virulicide

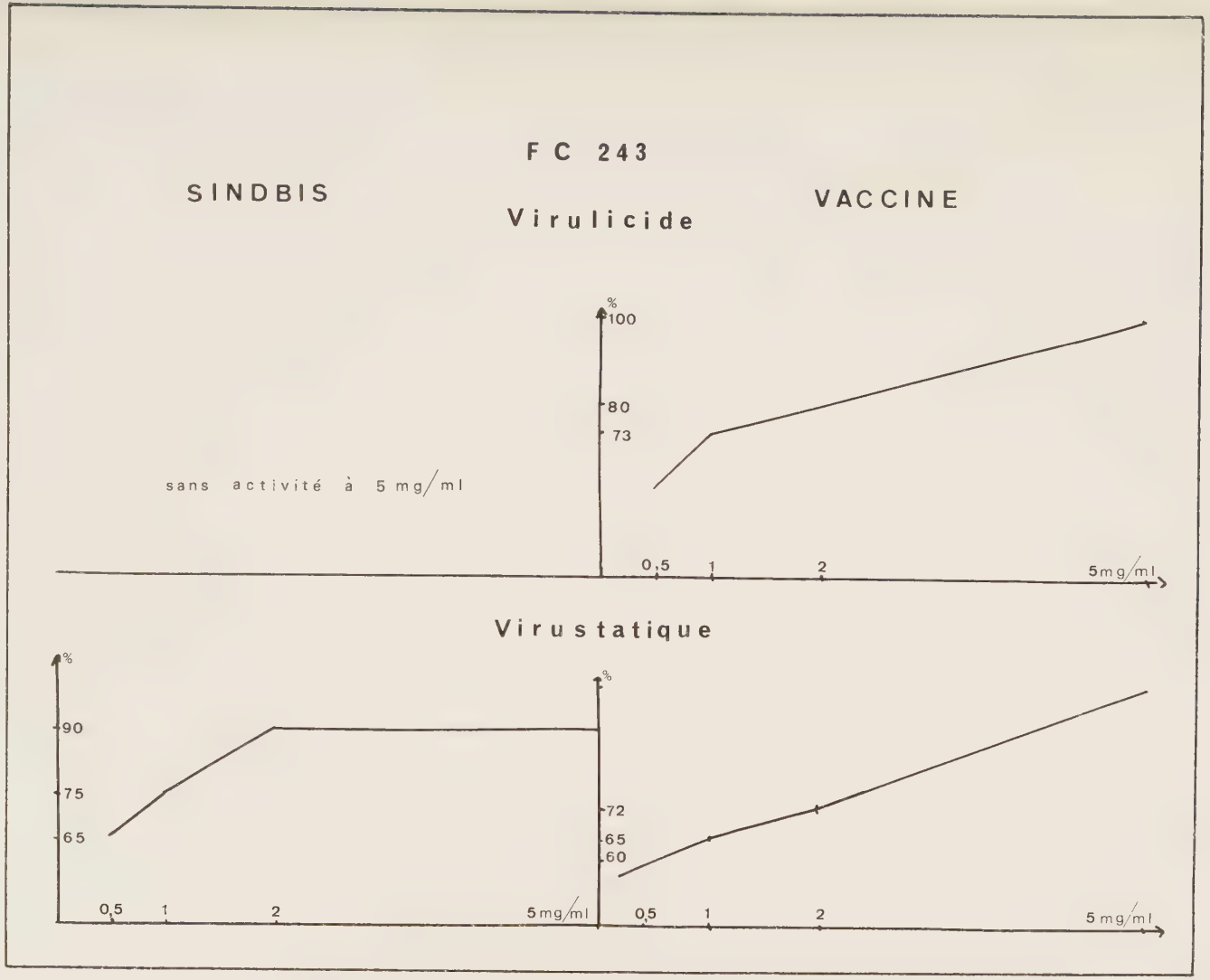




Virustatique






F C 243
SINDBIS
VACCINE
Virulicide
%
100
80
73
sans activité à 5 mg/ml
0,5
1
2
5mg/ml
Virustatique
%
90
75
65
0,5
1
2
5 mg/ml
%
72
65
60
0,5
1
2
5 mg/ml

LES DERIVES DE LA GUANIDINE

Nous avons continué ici l'étude entreprise par le Laboratoire sur l' A. B. O. B., c'est àdire le chlorhydrate de N'_1 - N'_1 anhydrobis (béta-hydroxy-éthyl) biguanide. Cette substance est commercialisée en France sous le nom de VIRUSTAT. On trouvera dans la thèse de ZEKAM (262) la bibliographie détaillée relative à ce produit.

Nous nous bornerons à rappeler que l'A. B. O. B. a été utilisé dans la prophylaxie et le traitement d'un certain nombre de viroses avec des succès divers. Il serait actif dans des affections variées telles que grippes, rougeole, oreillons, zona, herpes et varicelle, les trois premières étant provoquées par des virus à ADN. Cettes absence de spécificité est intéressante surtout dans le domaine des affections respiratoires où l'agent responsable n'est connu en général que rétrospectiviement. Les résultats obtenus jusqu'ici au Laboratoire ont été décevants (261).

ESSAIS REALISES AVEC L'A. B. O. B.

ACTIVITE LIMITE

VIRUS SINDBIS

Sur ce virus à ARN, l'activité de ce produit se manifeste presque uniquement dans le domaine de la taille des plages et non dans celui de leur nombre. La ligne d'inhibition est en effet assez difficile à déterminer car la taille des plages va en s'amenuisant au fur et à mesure que la concentration augmente. A l'oeil nu, la disparition des plages s'observe à 2 cm - 2,10 cm et 2,35 cm pour une concentration maximale de 10 mg/ml, ce qui correspond à une activité limite de 4,45 mg/ml.

A la loupe ou au microscope, il est possible de distinguer des plages extrêmement petites légèrement au délà de cette limite.

VIRUS VACCINAL

Cette substance semble plus active sur le virus vaccinal, puisque nous avons obtenu une activité limite très nette à 2,50 - 2,65 et 2,65 cm soit une moyenne de 2,60 cm, ce qui correspond à 1,10 mg/ml, la concentration maximale étant de 2 mg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

La notion que l'A. B. O. B. est plus virustatique que virulicide est maintenant classique (51- 77). Nos résultats confirment ce fait

VIRUS SINDBIS

Témoin = 58

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	50 mg		TOXIQUE	
	TOXIQUE		25 mg	-	-	-
-	-	-	5 mg	11	42	80, 5
0	58	100	2, 5 mg	-	-	-
-	-	-	500 µg	15	38	71
35	23	39, 5	250 µg	-	-	-
-	-	-	50 µg	18	35	68
42	16	27, 5	25 µg	-	-	-
-	-	-	5 µg	22	31	60

VIRUS VACCINAL

Témoin = 48

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
-	-	-	10 mg	0	48	100
1	47	98	5 mg	7	41	86
6	42	87, 5	2 mg	7	41	86
25	23	43	1 mg	17	31	64, 5

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons les résultats suivants :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
ACTIVITE VIRULICIDE	2, 5 mg	235 µg	-	5, 5 mg	1 mg	-
ACTIVITE VIRUSTATIQUE	70 % de 25 g à 500 µg			10 mg	0, 30 µg	-
ACTIVITE LIMITE		4, 53 mg/ml			1, 20 mg/ml	
CYLINDRES		néant			-	

ESSAIS IN OVO

ACTIVITE VIRUSTATIQUE

Les oeufs ont reçu quatre jours de suite, à 24 heures d'intervalle 0,2 ml d'une solution d'A. B. O. B. à 10 mg/ml, ce qui correspond 4 fois 2 mg, soit 8 mg en tout.

Le quatrième jour, immédiatement après inoculation de l'A. B. O. B. tous les oeufs traités sauf cinq qui serviront de témoins d'inocuité, plus cinq oeufs non traités, qui serviront d'infection virale, recoivent 0,1 ml d'une suspension de virus de la maladie de NEWCASTLE à 10^{-6} soit environ 10 particules infectantes.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Nbre d'oeufs inoculés	Jour de lecture	2	3	4	5	6	7
5	Témoins A. B. O. B.			5v	5v	1+, 4v	2+, 3v
10	Témoins virus			10v	10v	9+, 1v	10+
55	Essai	54v	2+, 53v	7+, 48v			
				43v	10+, 33v	37+, 6v	43=

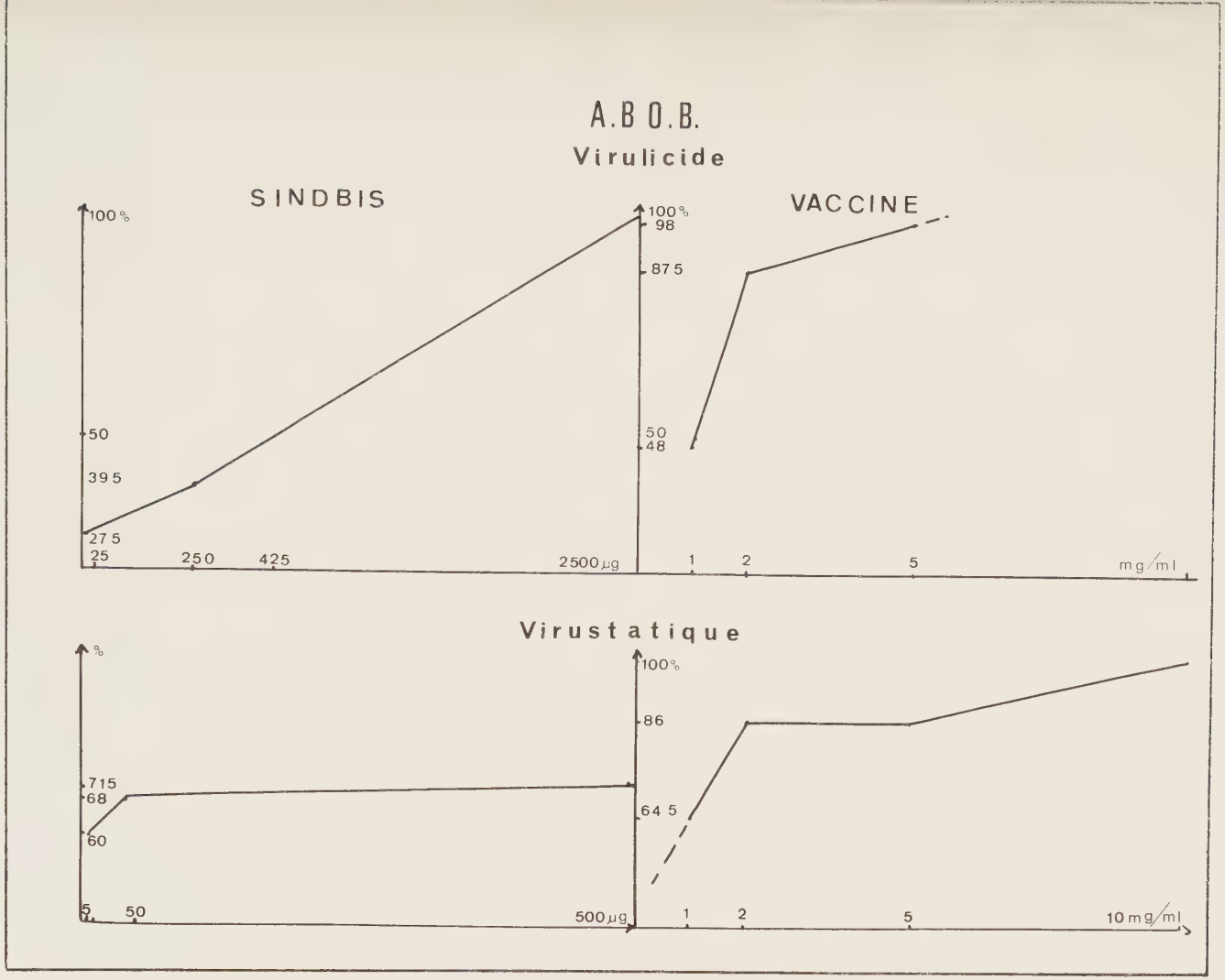
Dans ces conditions, l'A. B. O. B. ne possède donc aucun pouvoir protecteur contre le virus de la maladie de NEWCASTLE chez l'embryon de Poulet.

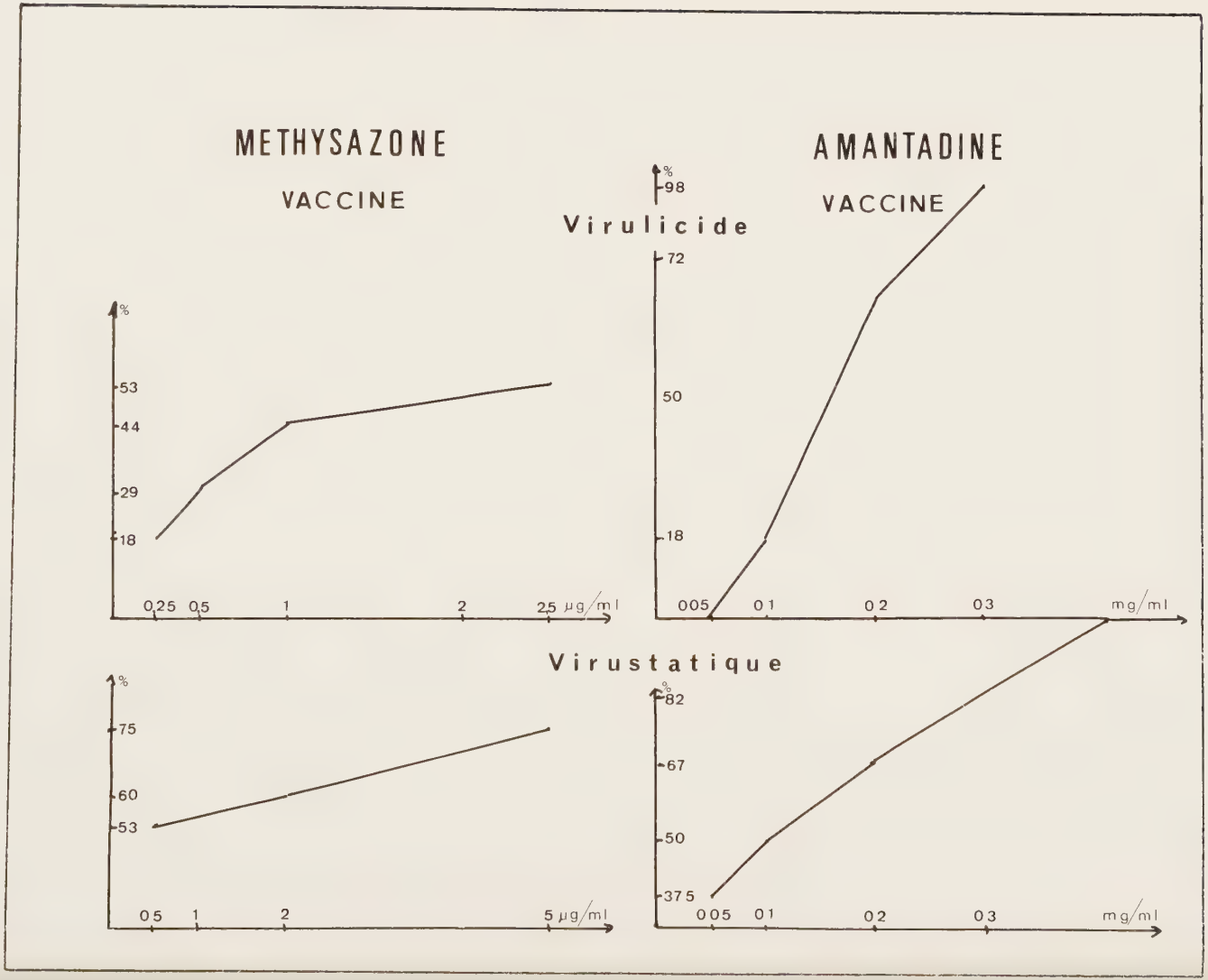
ACTIVITE VIRULICIDE

Différentes concentrations d'A. B. O. B. sont mises en contact avec environ 10. 000 particules infectantes. Une heure plus tard le mélange est inoculé à des séries de cinq oeufs.

A. B. O. B	1° jour	2° jour	3° jour
2.10^{-3}	5 v	4+, 1v	5+
10^{-3}	5 v	5+	5+
5.10^{-4}	5 v	3+, 2v	5+
2.10^{-4}	5 v	3+, 2v	5+
10^{-4}	5 v	2+, 2, 1v	5+
5.10^{-5}	5 v	5+	5+
2.10^{-5}	5 v	3+, 2v	5+
10^{-5}	5 v	5+	5+

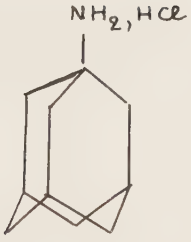
Aucune activité virulicide n'est donc décelable dans ce système.


A.B O.B.
Virulicide
SINDBIS
VACCINE
100 %
50
39 5
27 5
25
250
425
2500 µg
100 %
98
87 5
50
48
1
2
5
mg/ml
Virustatique
%
715
68
60
5
50
500 µg
100 %
86
64 5
1
2
5
10 mg/ml


METHYSAZONE
VACCINE
%
53
44
29
18
0,25 0,5 1 2 2,5 µg/ml
AMANTADINE
VACCINE
%
98
72
50
18
005 01 02 03 mg/ml
Virulicide
Virustatique
%
75
60
53
0 5 1 2 5 µg/ml
%
82
67
50
37 5
005 01 02 03 mg/ml

AMANTADINE

(ADAMANTANAMINE)



L'adamantanamine s'est révélée active chez l'homme contre le virus de la grippe A_2.

SABIN (198), en étudiant l'activité de cette nouvelle substance sur diverses souches virales, note que seul le virus A_2 est atteint, mais ni le virus de l'Influenza B, des parainfluenza 1, 2, 3, de la maladie de NEWCASTLE, ni les Rhinovirus, le virus syncitial respiratoire, ni les Adenovirus, ni les Herpesvirus (157).

Par contre, d'autres auteurs (44, 50, 147) ont mis en évidence l'inhibition du virus de la Rubéole in vitro.

IN VITRO

Les essais réalisés in vitro rapportés par de nombreux auteurs à propos de l'Amantadine ne coïncident pas. On ne sait si cela tient aux souches qui peuvent contenir des particules résistantes, ou aux différents passages effectués dans les divers laboratoires sur un matériel variable.

Avec cette substance, SABIN remarque que l'inhibtion du virus de la grippe A_2 n'est effective qu'à condition que l'inoculum de virus apporté à la

culture soit faible. Lorsque la dose de virus représente plus d'une unité infectante pour 10^3 cellules, la multiplication progressive n'est pas empêchée.

IN OVO

L'activité de l'amantadine sur le virus grippal peut être mise en évidence de deux façons : soit par le développement de l'infection virale dans l'oeuf, soit par la diminution du pouvoir hémagglutinant.

IN VIVO

Les essais in vivo peuvent être réalisés sur la Souris, sur le Furet (50), et sur l'Homme (260).

En fait, l'effet est minime, bien que statisquement valable, mais il faut de très fortes doses.

On retrouve avec les essais in vivo le même phénomène qu'avec l'uréthane : lorsque la dose augmente, le nombre d'animaux survivants n'augmente pas, mais le temps de survie augmente.

Sur le furet, au contraire, COCHRAN (44) a montré que l'amantadine aggrave la maladie plutôt qu'elle ne l'affaiblit.

ESSAIS REALISES AVEC L'AMANTADINE

IN VITRO

ACTIVITE LIMITE

VIRUS SINDBIS

Nous n'avons obtenu aucune limite d'activité avec cette substance même à la dose de 1 g/ml.

VIRUS VACCINAL

Avec une concentration maximale de 1 mg/ml, la limite d'activité se manifeste à 1,7 cm, soit pour une dose de 0,35 mg/ml.

ACTIVITE VIRUSTATIQUE ET VIRULICIDE

VIRUS SINDBIS

Aucune activité n'a été décelée vis à vis de ce virus par nos méthodes d'expérimentation.

VIRUS VACCINAL Témoin = 321

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T - m	%		m	T - m	%
14	307	33	0,3 mg	58	263	82
39	232	72	0,2 mg	103	218	67
263	58	18	0,1 mg	159	162	50
323	0	0	0,05 mg	200	121	37,5

ESSAIS IN OVO

VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

Activité virulicide

Le protocole d'essai habituel nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

Amantadine	1° jour	2° jour	3° jour
2.10^{-1}	5+	5+	5+
$1,5.10^{-1}$	5+	"	"
10^{-1}	5+	"	"
5.10^{-2}	1+, 4v	"	"
10^{-2}	5v	5+	"
5.10^{-3}	5v	"	"
2.10^{-3}	5v	"	"
10^{-3}	5v	"	"

Ainsi, la toxicité de l'Amantadine se manifeste jusqu'à la concentration 5.10^{-2} (50 mg/ml). Au dessous de celle-ci, elle est inactive sur le virus de la maladie de NEWCASTLE chez l'embryon de Poulet.

VIRUS DE LA GRIPPE DU TYPE 1, PR 8

Activité virulicide

Le protocole d'essai a été décrit dans le chapitre des méthodes d'étude IN OVO.

Dans le tableau ci-dessous, nous avons représenté par le signe + une hémagglutination, et par le signe - l'absence d'hémagglutination.

Amantadine	Taux de dilution du liquide allantoïque						
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
7.10^{-2}	+	+	+	+	+	+	
5.10^{-2}	+	+	+	+	+	+	
2.10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+
5.10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+

La différence de pouvoir hémagglutinant déterminée dans chaque série inoculée ne paraît pas significative : on ne peut donc conclure à aucun effet virulicide de l'Amantadine vis à vis du virus grippal PR 3.

CONCLUSION

La spécificité de cette substance étant particulièrement étroite il semble que son utilisation à bon escient soit bien difficile. Et ceci d'autant plus que le diagnostic exact de la souche de virus grippal responsable d'une affection individuelle ou épidémique se fait le plus souvent rétrospectivement en détectant les anticorps, plutôt qu'en isolant le virus, cet isolement étant le fait de Laboratoire de Virologie spécialisé.

DERIVES DE SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES

I. URETHANE
II. N. METHYL-ISATINE-BETA-THIO-SEMI-CARBAZONE
III. GLYOXAL
IV. GLUTARALDEHYDE
V. QUINONES

I. URETHANE OU CARBAMATE D'ETHYLE

Si la découverte des propriétés anesthésiantes de l'Uréthane remonte à 1895, ses propriétés antitumorales n'ont été mises en évidence par HADDOW et SEXTON qu'en 1946 (90).

La même équipe remarquant comme effet secondaire une leucopénie chez les patients traités, essayait aussitôt l'Uréthane comme antileucémique (160).

Peu de temps après, BRYAN et coll. (29) montraient que les tissus de souris spontanément leucémiques retenaient plus longtemps le carbone marqué radioactif de l'Uréthane que les tissus de souris normales.

Le mécanisme d'action de cette substance a été étudié par BOYLAND et RHODEN (21). Ces auteurs ont montré que l'utilisation de l'oxygène n'était pas modifiée mais que la synthèse des acides nucléiques, par l'intermédiaire des phosphokinases était pertubée.

KRAKOFF (129) en déduit une interférence avec les pyrimidines.

Cette explication, qui apparente l'Uréthane aux antimétabolites, a donné l'idée de l'utiliser dans les viroses : LINK etBLAŠKOVIČ (141) l'ont expérimenté sur la Souris infectée expérimentalement et ont remarqué que le temps de survie de l'animal était proprotionnel à la dose d'Uréthane administrée : ainsi une souris infectée avec 10^3 DL 50 de virus recevant 2,5 mg d'Uréthane meurt en même temps que celle qui a reçu $10^{2,4}$ DL 50 ; et celle qui a reçu 25 mg d'Uréthane meurt en mêm temps que celle qui a été inoculée avec $10^{1,6}$ DL 50.

Là encore, la protection paraît plus intense lorsque l'inoculum viral est plus faible. Mais la protection contre la mortalité n'est pas significative, du point de vue statistique.

Aussi JASINKA, LINK et coll. ont essayé l'association de l'Uréthane à un autre médicament, en recherchant une synergie possible (116). Ils ont montré ainsi que l'Uréthane renforçait l'action des arapyrimidines. Par ailleurs, CHOUROULINKOV et RIVIERE ont étudié l'association de l'Uréthane et des rayons X (42).

ESSAIS REALISES AVEC L'URETHANE -IN VITRO

ACTIVITE LIMITE

Que ce soit avec le virus SINDBIS ou avec le virus vaccinal, nous n'avons obtenu aucune modification de la culture par rapport au témoin; en particulier le nombre et la taille des plages dans le groupe des essais et dans celui des témoins est identique.

A la concentration maximale de 50 mg/ml, nous avons observé une véritable fixation des cellules. Avec une concentration maximale de 10 mg et 1 mg/ml, les plages confluent comme dans les cultures témoins.

ACTIVITE VIRULICIDE

Virus SINDBIS Témoin = 78

ACTIVITE			DOSE/ml
m	T - m	%	
Mort des cellules			500 mg
71	7	9	50 mg
74	4	5	5 mg
75	3	4	0,5 mg
78	0	0	0,05 mg
79	0	0	0,005 mg

Virus Vaccinal

Les résultats ne présentent pas plus d'intérêt, aussi nous ne les reproduirons pas ici.

IN OVO

Les résultats sont plus encourageants car l'oeuf se comporte comme un organisme vivant entier, et de ce fait, est moins fragile que la cellule isolée. La toxicité est donc moins importante dans l'oeuf ce qui a permis d'obtenir les résultats suivants par la méthode habituelle, sur le virus de la maladie de NEWCASTLE.

Activité virulicide

Dose	Nombre d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		% Survivants
				Morts	Vivants	
10^{-1}	5	0	5	0	5	100
5.10^{-2}	5	5	0	5	0	0
$2,5.10^{-2}$	5	5	0			
10^{-2}	5	5				

Ici l'expérience ne nous a pas donne d'effet intermédiaire entre l'activité totale (100 % de survivants à 100 mg/ml) et l'activité nulle (0 % de survivants à 50 mg/ml).

Chez l'homme, l'Uréthane n'est pas très toxique ; cependant il s'agit d'un poison cumulatif : en vingt quatre heures, il s'en élimine 90 % par les poumons, 9 % par l'urine et 1 % reste réparti dans les différents tissus (29).

II. Les dérivés de la Thiosemicarbazone -

La première observation relative à l'activité de la thiosemicarbazone est dûe à DOMAGK (60, 61). Les effets secondaires de leucopénie avec agranulocytose ont conduit à explorer les activités antimitotiques et antivirales des corps de la série des thiosemicarbazones.

L'activité antivirale d'un tel dérivé a été rapportée pour la première fois par HAMRE, BERNSTEIN et DONOVICK en 1950 (91).

En 1960, SHEFFIELD, BAUER et STEPHENSON (205) puis en 1962 SHEFFIELD montrent que l'isatine-bêta thiosemicarbazone inhibe la multiplication du Rabbit-Pox en système E R K 1, à une concentration atoxique pour les cellules (206).

En 1962, EASTERBROOK démontre que l'isatine bêta thiosemicarbazone affecte le cycle viral : Les cellules produisent de l'antigène viral, l'A. D. N. viral mais les particules virales sont immatures (67).

BAUER en 1963 essaye le dérivé méthylé N. méthyl-isatine-bêta-thiosemicarbazone ou méthysazone* (MARBORAN) dans la prophylaxie de la variole et montre quelque effet encourageant dans le traitement de l'épidémie de MADRAS à cette époque. (8).

APPLEYARD et coll. en 1965 prouvent que ces dérivés sont plus virustatiques que virulicides et que la fluorophénylalanine inverse les effets de l'isatine-thiosemicarbazone (7).

MAGEE et BACH (151) observent en culture cellulaire une très légère diminution du métabolisme des acides nucléiques de la cellule hôte soumise à une concentration de substance capable d'inhiber la production de virus. Leurs expériences montrent que ces dérivés entrent en composition avec les précurseurs des A. D. N. viraux de la Thymidine-Kinase, mais ce site n'est pas le stade essentiel de l'inhibition.

WOODSON et JOKLIK ont récemment montré que c'est au niveau de l'A. R. N. messager secondaire (c'est à dire celui qui est synthétisé après trois heures dans le cycle infectieux) que se produit le trouble. Il y aurait alors un défaut de formation des protéines virales (197, 261).

En dehors de la Methysazone, un autre dérivé le 4 bromo-3méthyl-isothiazole 5 carboxaldéhyde thiosemicarbazone (M et B 77 14) a été essayé in vitro et in vivo avec un succès égal par RAO et COLL. (186, 187).

*Dénomination commune.

ESSAIS REALISES AVEC LA N-METHYL-ISATINE-BETA-THIO-SEMI-CARBAZONE IN VITRO

Etant donnée la spécificité étroite de la N-méthyl-isatine-bêta-thio-semi-carbazone (commercialisée sous le nom de MARBORAN en Angleterre) vis à vis des Pox-virus, nous avons étudié son activité sur le virus vaccinal seulement.

ACTIVITE LIMITE

Virus vaccinal

A la concentration maximale de 5 µg/ml, l'activité limite s'est manifestée à 2,65, 2,60 et 2,70 cm, ce qui correspond à une dose de 2,76 µg/ml.

A la concentration maximale de 10 µg/ml, nous avons obtenu les chiffres suivants : 1,25, 1,25, 1,35 cm, ce qui correspond à une activité limite de 2,65 µg/ml.

ACTIVITE VIRUSTATIQUE ET VIRULICIDE

Virus Vaccinal Témoin = 206

ACTIVITE VIRULICIDE			DOSE/ml	ACTIVITE VIRUSTATIQUE		
m	T-m	%		m	T-m	%
96	110	53	5 µg	51	155	75
115	91	44	2 µg	84	122	60
146	60	29	1 µg	106		
169	37	18	0,5 µg	98	108	53

Après construction du graphique, nous obtenons les résultats suivants :

	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	9 µg/ml	2 µg/ml	—
Activité virustatique	10 µg/ml		—
Activité limite	2,70 µg/ml		

ESSAIS IN OVO

ACTIVITE VIRUSTATIQUE

Virus vaccinal

Trente oeufs ont reçu cinq jours de suite 200 µg de Méthysazone, trente autres 100 µg, soit 1 mg en tout pour le premier groupe et 500 µg pour le second.

Le cinquième jour, immédiatement après le traitement, tous, sauf cinq témoins de chaque groupe, sont inoculés selon le procédé indiqué dans le chapitre des méthodes d'étude, avec environ dix particules infectantes de virus vaccinal. Trois jours plus tard, les membranes chorio-allantoïques montrent des pustules que l'on dénombre.

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les résultats obtenus avec les témoins et les différentes doses de substance antivirale.

LE GLYOXAL CHO-CHO

On sait depuis les travaux d'UNDERWOOD en 1956 (234) que le glyoxal permet de stériliser le sang et le plasma. Parallèlement et séparément, en 1957 THOMAS et HANNOUN (228, 229) d'une part et DE BOCK et Coll. d'autre part, montraient l'action du glyoxal et de ses dérivés (53).

Depuis ,l'activité du glyoxal et de ses dérivés a fait l'objet de très nombreuses recherches. En particulier, THOMAS et HANNOUN (229) ont montré le mécanisme de son action sur le virus grippal, THOMAS, BARBEE, et COCIORA (226) d'une part et BAYLOR et EGYUD (12) d'autre part, ont étudié leur action sur les phages du colibacille, de Salmonelles et de Shigelles.

Bien que leurs avis diffèrent quant au mode d'action, il semble que le glyoxal agisse sur les groupements aminés des protéines intervenant dans la fixation des plages sur la bactérie.

Par ailleurs, des recherches sur l'activité antivirale du glyoxal et de ses dérivés ont été poursuivies parTIFFANY et Coll. (230, 231), UNDERWOOD et Coll (235), MAC LIMANS (149) et ENGLE et LIU (72).

ESSAIS REALISES AVEC LE GLYOXAL

ACTIVITE LIMITE

Virus SINDBIS

Avec une concentration maximale de 250 µg/ml, nous obtenons une ligne de toxicité à 3 cm et une ligne d'activité limite pour une moyenne de 2,60 cm soit pour une concentration de 132 µg/ml.

Virus VACCINAL

Avec une concentration maximale de 500 µg/ml, la limite d'activité se manifeste à 2,25 cm, soit pour une concentration de 235 µg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

IN VITRO

Virus SINDBIS Témoin = 85

ACTIVITE VIRULICIDE			DOSE/ml	ACTIVITE VIRUSTATIQUE		
m	T-m	%		m	T-m	%
0	85	100	1 µg	-	-	-
0	85	100	0,5 µg	3	29	90
2	83	98	0,25 µg	9	23	71
12	73	86	100 µg	-	-	-
58	27	32	10 µg	-	-	-
62	23	27	1 µg	-	-	-
62	23	27	0,5 µg	45	-	-
85	0	0	0,25 µg	41		

Virus vaccinal

Témoin = 321

m	T-m	%	Dose/ml	m	T-m	%
120	201	63	0,2 µg	129	192	60
126	195	61	0,1 µg	132	189	59
146	176	55	0,05 µg	138	183	57
150	171	53	0,025 µg	143	178	55

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	85 µg	11 µg	0,25 µg		25 µg	
Activité virustatique	800 µg	45 µg	1 µg		25 µg	
Activité limite						
gradients	132 µg/ml			235 µg/ml		
cylindres						

IN OVO

Activité virulicide

Dose	Nombre d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		%
				Morts	Vivants	Survivants
$7,5.10^{-4}$	5	0	5	-	5	
5.10^{-4}	5	0	5	-	5	
3.10^{-4}	5	0	5	0	5	100
2.10^{-4}	5	2	3	2	4	67
10^{-4}	5	4	1	6	1	14
$7,5.10^{-5}$	5	5	0	11	0	0
5.10^{-5}	5	5	5			

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons :

	100 %	90 %	0 %
Activité virulicide	0,3 mg/ml	0,145 mg/ml	7,5 mg/ml

CONCLUSION

Nos résultats sont en accord avec les remarques faites par BAYLOR et EGYUD (12) plutôt que celles de THOMAS (226). En effet, l'activité virustatique est nettement plus faible que l'activité virulicide : ce n'est donc pas au stade de la fixation du virus sur la cellule que se produit l'inhibition.

GLUTARALDEHYDE $CHO\ (CH_2)_3 - CHO$

L'action antibactérienne du Glutaraldéhyde a été découverte par PEPPER et Coll. (164). Deux ans plus tard, BORICK, DONDERSHINE & CHANDLER montraient que cette substance en solution à 2 % était très active sur les germes Gram positif et Gram négatif de même que sur les spores des anaérobies et aussi sur quelques virus. BLOUGHT (15) montra ensuite l'inactivation des Myxovirus par le glutaraldehyde, tandis que KLEIN et DEFOREST fixaient son activité antivirale entre 0,2 et 2 % suivant le virus en cause (127).

Le mécanisme d'action de cette substance ne fait aucun doute : il est certain que les protéines sont atteintes comme le montre la fixation des cellules par le glutaraldéhyde. Cette action est d'ailleurs mise à profit dans la fixation des préparations cellulaires destinées à être observées au microscope électronique.

ESSAIS REALISES AVEC LE GLUTARALDEHYDE - IN VITRO

ACTIVITE LIMITE

Virus SINDBIS

Nous avons obtenu l'activité à 2,5 cm avec une concentration maximale de 250 µg/ml, ce qui correspond à 127 µg/ml.

Virus vaccinal

L'activité limite se manifeste à 1,7, 1,8 et 1,6 cm avec une concentration maximale de 100 µg/ml, soit pour une dose de 72 µg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

Virus SINDBIS

ACTIVITE VIRULICIDE			DOSE:ml	ACTIVITE VIRUSTATIQUE		
m	T-m	%		m	T-m	%
Témoin = 40						
-	Toxique	-	100 µg	-	-	-
3	37	92	50 µg	-	-	-
7	33	81,5	25 µg	-	-	-
Témoin = 63						
-	-	-	10 µg	8	59	94
14	49	78	5 µg	18	45	72
25	38	62	0,5 µg	-	-	-
35	28	44	0,05 µg	35	28	44
-	-	-	10 µg	47	16	25
45	18	28,5	5 µg	-	-	-
61	2	3,5	0,5 µg	-	-	-

Virus vaccinal

ACTIVITE VIRULICIDE			DOSE/ml	ACTIVITE VIRUSTATIQUE		
m	T-m	%		m	T-m	%
48	274	85	10 µg	124	197	62
88	233	72	5 µg	126	195	61
130	190	59	1 µg	132	189	59
183	138	43	0,5 µg	174	147	46

Après construction des graphiques corrrespondants sur papier semi-logarithmique, nous obtenons les résultats groupés dans le tableau suivant :

	SINDBIS			VACCINE		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	90 µg	0,4 µg	0,7 µg	0,75	0,75 µg	-
Activité virustatique	12,5 µg	125 µg	1,25 µg	-	0,75 µg	-
Activité limite :						
gradient	127 µg/ml			72 µg/ml		
cylindres				18 mm		

IN OVO

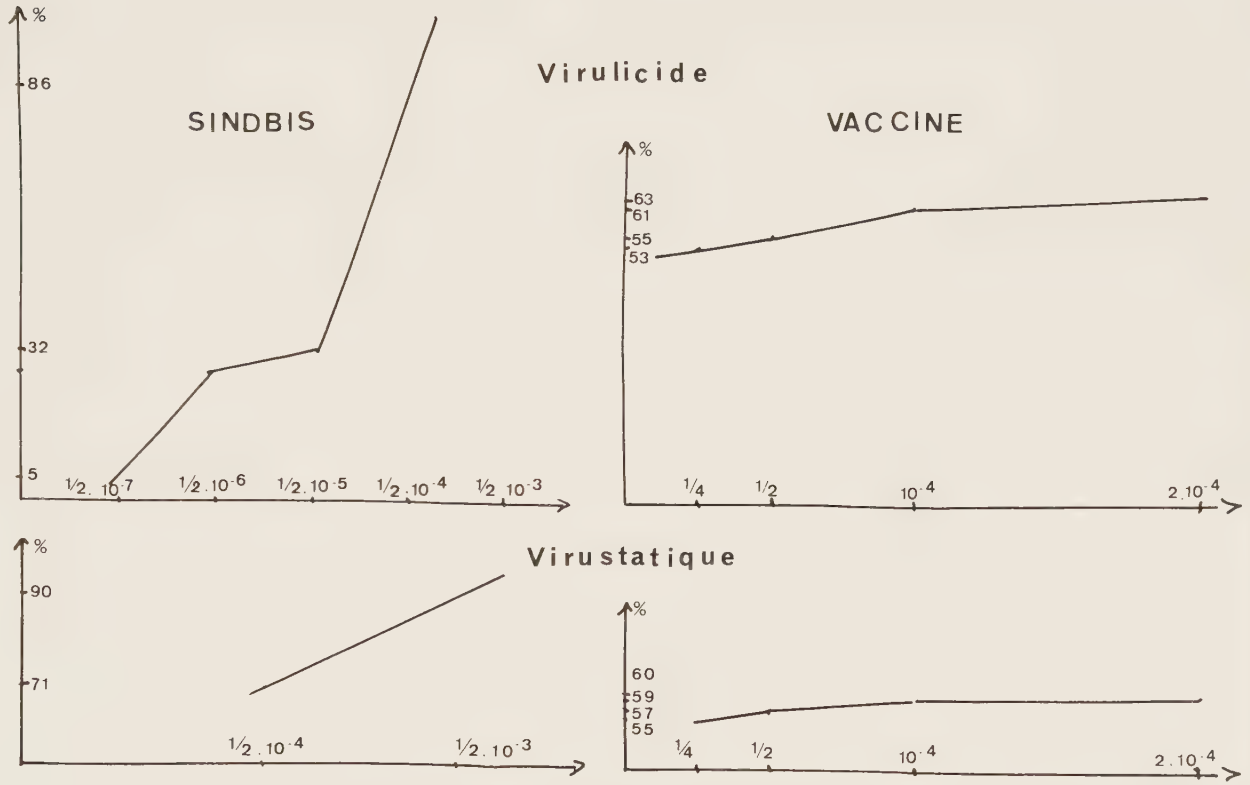
Activité virulicide

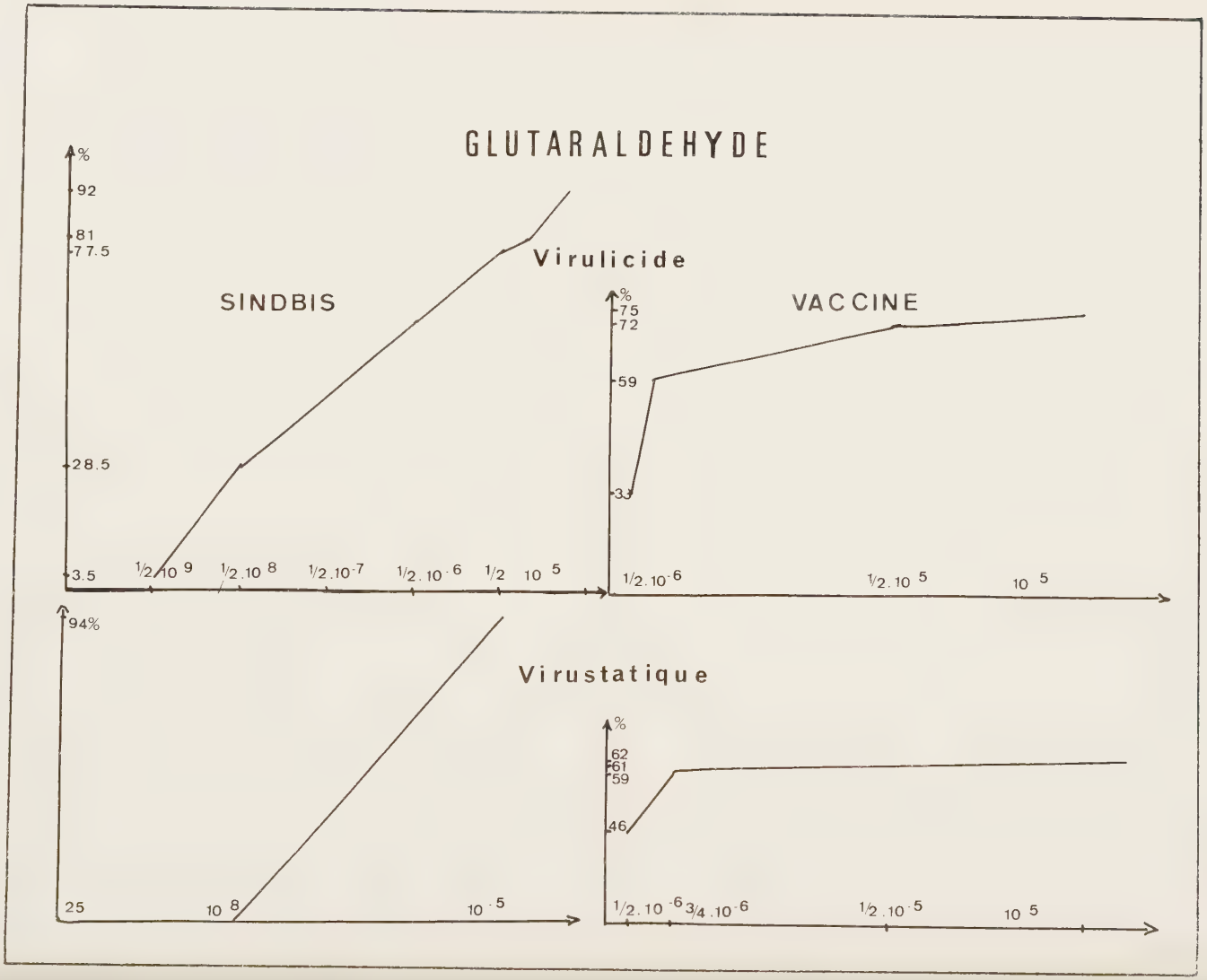
Dose	Nb d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		%
				Morts	Vivants	Survivants
5.10^{-2}	5	5	0	toxicité		
$2,5.10^{-2}$	5	5	0			
$1,25.10^{-2}$	5	3	2			
5.10^{-3}	5	3	2			
$2,5.10^{-3}$	5	0	5			
$1,25.10^{-3}$	5	0	5			
5.10^{-4}	5	0	5			
$2,5.10^{-4}$	5	0	5			
$1,25.10^{-4}$	5	0	5			
5.10^{-5}	5	0	5			
$2,5.10^{-5}$	5	0	5	0	15	100 %
$1,25.10^{-5}$	10	5	5	5	10	66 %
5.10^{-6}	10	10	0	15	0	0 %

Après concentration du graphique correspondant, nous obtenons :

Activité	100 %	50 %	0 %
Activité virulicide	25 µg/ml	10 µg/ml	0,5 µg/ml.

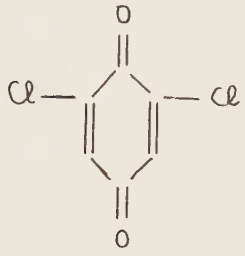
GLYOXAL


Virulicide
SINDBIS
%
86
32
5
1/2 . 10-7
1/2 . 10-6
1/2 . 10-5
1/2 . 10-4
1/2 . 10-3
VACCINE
%
63
61
55
53
1/4
1/2
10-4
2 . 10-4
Virustatique
%
90
71
1/2 . 10-4
1/2 . 10-3
%
60
59
57
55
1/4
1/2
10-4
2 . 10-4

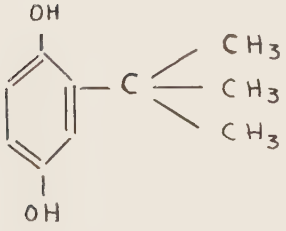

GLUTARALDEHYDE
%
92
81
77.5
28.5
3.5
SINDBIS
Virulicide
1/2.10 9
1/2.10 8
1/2.10-7
1/2.10-6
1/2 10 5
%
75
72
59
33
VACCINE
1/2.10-6
1/2.10 5
10 5
94%
25
Virustatique
10 8
10-5
%
62
61
59
46
1/2.10-6
3/4.10-6
1/2.10-5
10 5

FORMULES DES QUINONES ETUDIEES

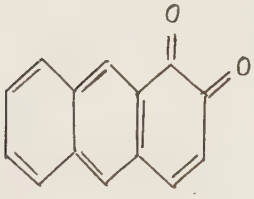
Dichloro 2-6 para-bénzoquinone



Butyl hydroquinone



Naphtoquinone 1-2



QUINONES

Dans cette série, nous avons étudié les substances suivantes :

- Dichloro -2-6- para benzoquinone
- Tert. Butyl hydroquinone
- Naphtoquinone

(voir les formules ci-contre)

ACTIVITE LIMITE

Virus Sindbis

Toutes ces substances très actives, mais très toxiques , ont lysé la culture cellulaire aux alentours de 10 µg/ml. La moins toxique et cependant active, est la Naphtoquinone.

La Dichlore-2-6-parabenzoquinone présente une activité limite à 3,8 et 3,9 cm pour des boites mesurant 5,5 cm de diamètre* avec une concentration maximale de 10 µg/ml, ce qui revient à une activité limite de 7 µg/ml.

La Tert. Buthyl-hydroquinone présente une activité limite à 2,7 - 2,65 - 2,6 - 2,8 cm, soit une moyenne de 2,7 cm pour une concentration maximale de 10 g dans des boites mesurant 4,9 cm de diamètre, ce qui revient à une dose de 5,6 µg/ml.

La Naphtoquinone 1-2 , avec une concentration maximale de 20 µg/ml, présente une activité limite à 2,8 - 2,65 - 2,85 cm, soit une moyenne de 2,76 cm dans une boite de 4,9 cm, ce qui correspond à une dose de 11,25 µg/ml.

* Distribuées par les Ets BLOCH, à STRASBOURG .

Virus Vaccinal

La Dichlore 2-6 para benzoquinone, avec une concentration maximale de 10 µg/ml, montre une activité limite à 3,0 - 2,8 - 3,0 cm, soit une moyenne de 2,93 cm, c'est à dire 6 µg/ml.

La Tert. Butyl hydroquinone, avec une concentration maximale de 20 µg/ml montre une activité limite à 1,65 - 1,55 - 2,05 cm, soit une moyenne de 1,75 cm, c'est à dire pour 7,14 µg/ml.

La Naphtoquinone 1-2 présente une activité limite à 0,85 cm - 0,95 cm (moyenne de 0,90 cm) pour une concentration maximale de 10 µg/ml, et 1,85 - 1,60 (moyenne de 1,72 cm) pour une concentration maximale de 5 µg/ml. Dans les deux cas, le calcul conduit à une activité limite de 1,80 µg/ml.

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE

Virus Sindbis

Dichloro 2-6 para benzoquinone

Activité virulicide			Dose/ml	Témoin = 30
m	T - m	%		
toxique	-	-	0,05 µg	
14	16	53	5 µg	
20	10	33,5	0,5 µg	
28	2	6,5	50 µg	
30	0	0	5 µg	

Activité virustatique

Malgré la protection par le sérum de veau, les cellules directement en contact avec le produit meurent très rapidement avec toute dose supérieure à 1 µg/ml, à cette dose, les plages formées sont normales et on observe une protection correspondant à 62 %.

Tert. Butyl hydroquinone

Activité virulicide			Dose/ml	Témoin = 104
m	T-m	%		
toxique	-	-	5 µg	
toxique	-	-	0,5 µg	
0	104	100	50 µg	
85	19	18	5 µg	
104	0	0	0,5 µg	
Activité virustatique				
m	T-m	%	Dose/ml	Témoin = 89
40	49	55	10 µg	
42	47	52,5	5 µg	
48	41	46	2 µg	
52	37	41	1 µg	

Naphtoquinone 1-2

Activité virulicide			Dose/ml	Témoin = 30
m	T-m	%		
8	22	77	5 µg	
15	15	50	0,5 µg	
22	8	26,5	0,05 µg	
23	7	23	5 µg	
Activité virustatique			Dose/ml	Témoin = 89
m	T-m	%		
toxique = lyse totale			5 µg	
légère toxicité : les cellules			2 µg	
meurent plus vite				
36	53	60	1 µg	
36	53	60	0,5 µg	

Virus Vaccinal

Dichloro 2-6 para benzoquinone — Témoin = 89

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T-m	%		m	T-m	%
toxique	-	-	10 µg	toxique	-	-
3	86	96	5 µg	légèrement toxique		
41	48	53	2 µg	43	46	52
44	45	51	1 µg	52	37	41,5

Tert Butyl hydroquinone — Témoin = 89

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T-m	%		m	T-m	%
0	89	100	10 µg	41	48	54
1	88	99	5 µg	55	34	38
26	43	48,5	2 µg	58	31	35
56	33	37	1 µg	60	29	32,5

Naphtoquinone 1-2 — Témoin = 89

Activité virulicide			Dose/ml	Activité virustatique		
m	T-m	%		m	T-m	%
toxique	-	-	5 µg	toxique		
42	47	53	2 µg	"		
80	9	10	1 µg	30	59	66
83	6	6,5	0,5 µg	48	41	46

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons les résultats rassemblés dans le tableau suivant :

SINDBIS

Produit	Activité virustatique par ml			Activité virulicide par ml			Activité limite par ml
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	
Dichloro 2-6 para benzoquinone	62 % à 1 µg			-	5,5 µg	0,4 µg	7 g
Tert. Butyl hydroquinone	-	3,75 µg	-	50 µg	9 µg	1 µg	5,6 µg
Naphtoquinone 1-2	60 % à 0,5 et 1 µg			87,5 µg	0,5 µg	-	11,3 µg

VACCINE

Produit	Activité virustatique par ml			Activité virulicide par ml			Activité limite par ml
	100 %	50 %	0%	100 %	50 %	0 %	
Dichloro 2-6 para benzoquinone	6,7 µg	1,8 µg	-	6,7 µg	2 µg	-	6 µg
Tert. Butyl hydroquinone	-	9,2 µg	-	5 µg	2,1 µg	-	7,15 µg
Naphtoquinone	1,8 µg	0,6 µg	-	3 µg	1,9 µg	-	1,80 µg

Ces deux tableaux montrent combien les doses actives de ces substances, sur le virus Sindbis et sur le virus vaccinal, sont proches les unes des autres.

Activité virulicide

Dichloro 2-6 para benzoquinone

Dose	Nb d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		%
				morts	vivants	survivants
2.10^{-3}	5	1	4	toxicité		
10^{-3}	5	0	5			
5.10^{-4}	5	0	5			
2.10^{-4}	5	0	5	0	9	100
10^{-4}	5	1	4	1	4	80
2.10^{-5}	5	5	0	6	0	0

Naphtoquinone 1-2

Dose	Nb d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		%
				morts	vivants	survivants
10^{-3}	5	2	3			
5.10^{-4}	5	0	5			
2.10^{-4}	10	0	10			
7.10^{-5}	10	0	10			
5.10^{-5}	10	0	10	0	22	100
2.10^{-5}	8	2	6	2	12	85
10^{-5}	8	5	3	7	6	46
7.10^{-6}	5	2	3	9	3	25
4.10^{-6}	5	5	0	14	0	0
2.10^{-6}	5	5	0			

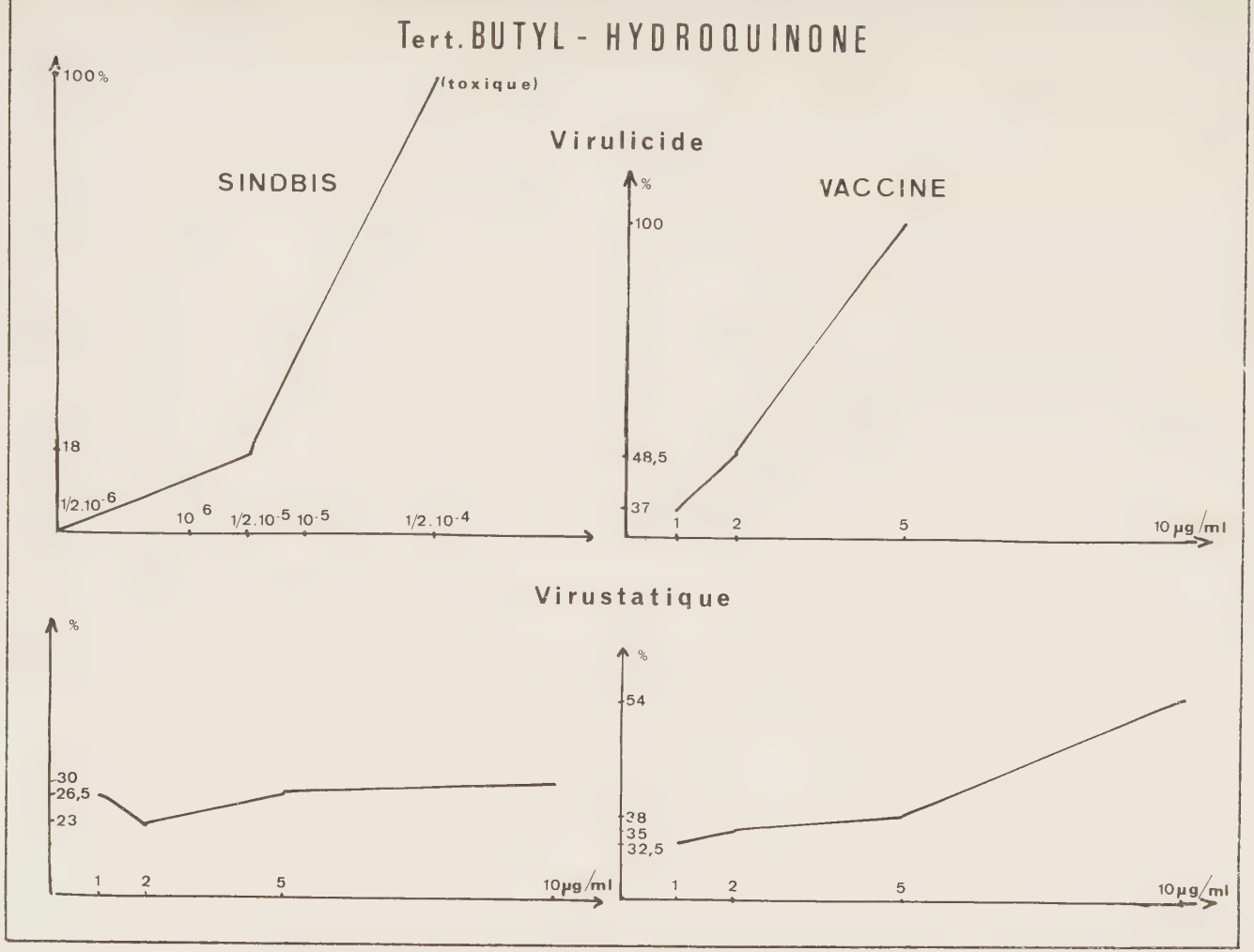
Tert. Butyl hydroquinone

Dose	Nb d'oeufs inoculés	Morts	Vivants	Total		%
				morts	vivants	survivants
10^{-2}	5	0	5	0	9	100
5.10^{-3}	5	1	4	1	4	80
2.10^{-3}	5	5	0	6	0	0
10^{-3}	5	5	0			

Après construction des graphiques correspondants, nous obtenons les doses efficaces suivantes, in ovo, vis à vis du virus de la maladie de NEWCASTLE.

Activité virulicide de	100 %	50 %	0 %
Naphtqouinone 1-2	50 µg/ml	11 µg/ml	4 µg/ml
Dichloro 2-6 p. benzoquinone	0,2 µg/ml	70 µg/ml	20 µg/ml
Tert. butyl hydroquinone	10 µg/ml	2,75 µg/ml	2 µg/ml

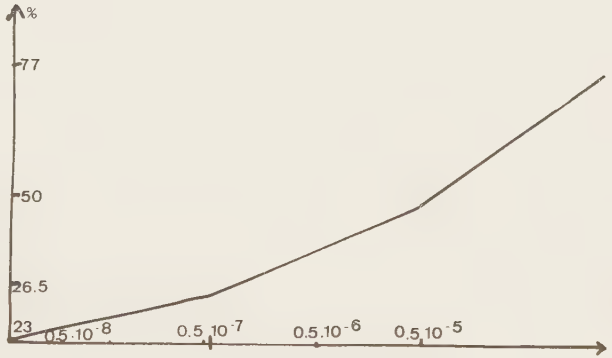
Nous avons ici un exemple caractéristique de substances antivirales à très larges spectre. Ils n'ont aucune spécificité comme le montre aussi leur action sur le virus de la maladie de NEWCASTLE in ovo. Il est probable que ces corps agissent sur un enzyme très répandu induit par les virus, à la manière des hydroquinoléines qui inhibent la neuraminidase induite par la plupart des virus de l'appareil respiratoire et quelques autres (22). Leur toxicité cependant reste élevée : leur coefficient thérapeutique est voisin de 1, si bien que l'utilisation de ces substances semble plus orientée vers la désinfection que vers la thérapeutique.


Tert. BUTYL - HYDROQUINONE
100 %
(toxique)
SINDBIS
Virulicide
%
VACCINE
100
18
48,5
37
1/2.10-6
10 6
1/2.10-5
10-5
1/2.10-4
1
2
5
10 µg/ml
Virustatique
%
%
30
26,5
23
54
38
35
32,5
1
2
5
10µg/ml
1
2
5
10µg/ml

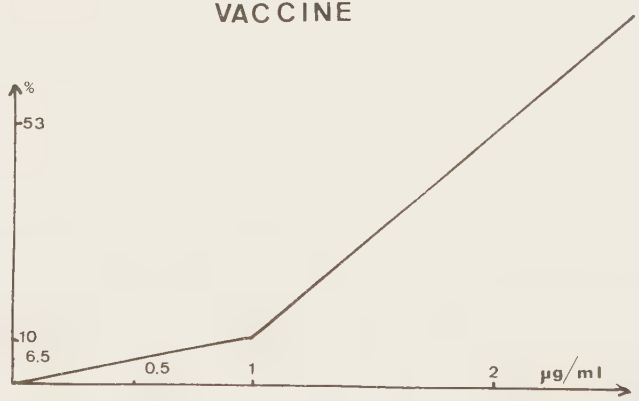
NAPHTO-QUINONE 1,2

Virulicide

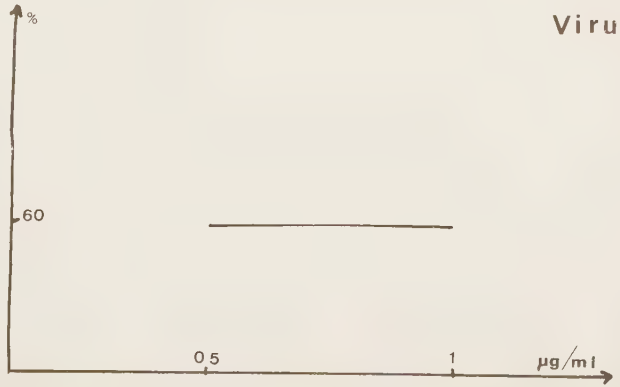
SINDBIS

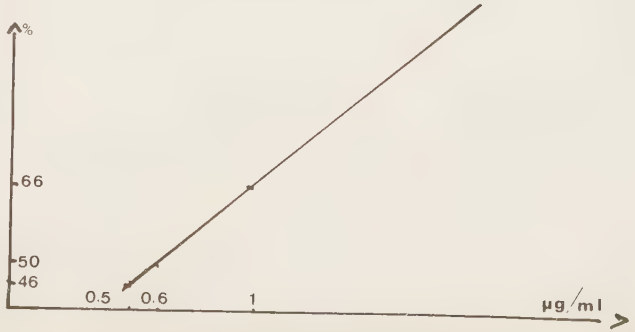


VACCINE



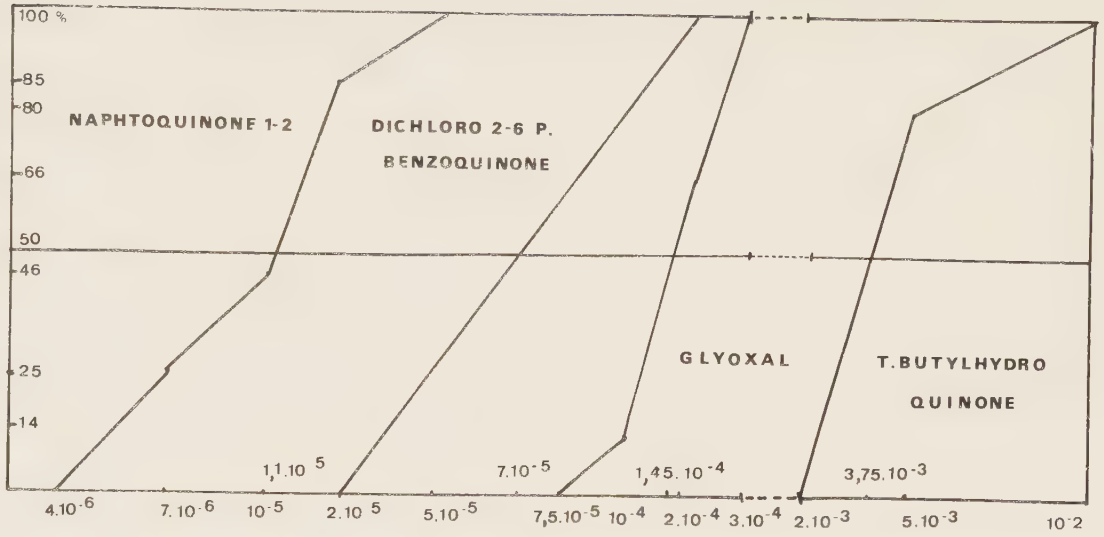
Virustatique





ESSAIS IN OVO

virus de la maladie de Newcastle



ACTIVITE VIRULICIDE, VIRUSTATIQUE ET LIMITE DES SINDBIS

PRODUIT	ACTIVITE VIRULICIDE			ACTIVITE VIRUSTATIQUE			ACTIVITE
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	LIMITE
1 MITOMYCINE	↗ du nombre de plages			↗ du nombre de plages			néant
2 F.D.A.	–	25 µg	–	500 µg	< 50 µg	–	205 µg
3 6 Aza U	néant	–	–	–	–	–	–
4 6 Aza C	néant	–	–	–	–	–	–
5 5 F.U.	7,5 mg	1,66 mg	1 g	7,5 mg	3,25 mg	–	4,55 mg
6 5 I.U.R.	5,75 mg	1,95 mg	0,25 mg	–	3,5 mg	50 µg	2 mg
7 5 I.U.D.R.	–	6,25 mg	–	1 mg	–	–	
8 5 B.U.R.D.	–	–	0,5 µg	–	–	–	
9 C.A.	sans activité			sans activité			néant
10 F.C. 10	1 mg	0,15 mg	–	2,05 mg	75 µg	–	320 µg
11 F.C. 11	130 µg	7,5 µg	–				157 µg
12 F.C. 44	↗ du nombre de plages				néant		0 à 1 mg
13 F.C. 47	↗ du nombre de plages			67 % d'activité entre 100 et 500 µ			0 à 1 mg
14 F.C. 144	550 µg	275 µg	–	700 µg	< 100 µg	–	615 µg
15 F.C. 243	0 à 5 mg			90 % à 2 mg			rien à 10 mg
16 A.B.O.B.	2,5 mg	285 µg	–	70 % de 25 à 500 µg			1,45 mg
17 AMANTADINE	aucune activité			aucune activité			
18 URETHANE	–	> 50 µg					
19 M.I.B.T.	n'a pas été essayé		–	–	–	–	–
20 GLYOXAL	85 µg	11 µg	25 ng	0,80 mg	45 µg	1 ug	132 µg
21 GLUTARALDEHYDE	90 µg	0,1 µg	0,7 ng	12,5 µg	125 ng	1,25 ng	127 µg
22 DICLORO 2_6 pBq	toxique	5, 50 µg	0, 40 ng	toxique	toxique	–	7 µg
23 Tert. BUTYLHYDRO Q	toxique	3,75 µg	1 g	–	3,75 µg	–	5,6 µg
24 Napko Q *-2	87,5 µg	0,5 µg	–	60 % à 0,5 et 1 µg		–	11,3 µg

SUBSTANCES ETUDIEES (exprimées PAR ml) SUR LES VIRUS VACCINE

ACTIVITE	ACTIVITE VIRUSTATIQUE			ACTIVITE VIRULICIDE			CYLINDRES
LIMITE	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	100 µg
néant	très léger effet				néant		néant
205 µg	500 µg	<50 µg	–	375 µg	25 µg	–	
55 µg	7,8 mg	env. 50 µg	–	1,05 mg	0,75 mg	50 µg	néant
63 µg	–	0,5 mg	–	2,4 mg	0,60 mg	50 µg	néant
							–
	1,35 mg	–	–	1 mg	0,17 mg	0,17 mg	20 mmm
0,55 µg	10 µg	1,25 µg	–	9 µg	1,25 µg	–	30,5 mm
	5 µg	–	–	5 µg	0,25 µg	–	50 mm
148 µg	5 µg	–	–	2,2 µg	0,6 µg	–	47 mm
0,36 mg	950 µg	25 µg	–	630 µg	275 µg	25 µg	26 mm
0,49 mg	60 % d'activité entre 100 et 500 g			–	455 µg	50 µg	
100 µg	4 µg	–		100 µg	4 µg	–	
7,35 mg	5 mg	–	–	5 mg	0,10 mg	–	17 mm
1,08 mg	10 mg	0,30 mg	–	5,5 mg	1 mg	–	
							40 mm
2,70 µg	10 µg	–	–	9 µg	? µg	–	–
235 µg	–	# 25 µg	–	–	# 25 µg	–	16 mm
72 µg	–	0,75 µg	–	–	0,75 µg	–	18 mm
6 µg	6,7 µg	1,8 µg	–	6,7 µg	2 µg	–	16 mm
7,15 µg	–	9,2 µg	–	5 µg	2,10 µg	–	32 mm
1,80 µg	7,8 µg	0,6 µg	–	3 µg	1,9 µg	–	18 mm

CONCLUSION

Nous avons déjà donné, à la fin de la première partie de ce travail, le résumé de la méthode permettent d'obtenir les résultats les plus fidèlement reproductibles, tout en conservant une technique assez simple pour être adaptable à des essais de routine en série.

Il nous parait cependant capital d'insister sur les conditions indispensables à l'obtention de plages reproductibles.

1) La qualité de la trypsination doit être telle que les fibroblastes soient parafaitement détachés les uns des autres, sans que les parois cellulaires soient attaquées. Les cellules comptées ultérieurement doivent être isolées et bien vivantes.

2) La quantité de cellules mise en jeu : le taux de 2 millions de cellules par millilitre de suspension représente un minimum que l'on peut très légèrement dépasser, mais en deça duquel on ne peut descendre. L'excès important conduit à un décollement de la couche cellulaire en nappe dont les replis ne permettront pas de repérer les plages; le défaut, à des décollements individuels, et l'effet cytopathogène ne sera plus visible à l'oeil nu.

3) L'élimination des produits de déchet du métabolisme cellulaire est essentielle. Sinon la culture dégénère et les virus ne peuvent développer leur action cytopathogène.

4) Le temps d'adsorption du virus doit être respecté : certains, tels le virus Sindbis et le virus Vaccinal s'adsorbent complétement en une heure; d'autres demandent un laps de temps plus important : 7, 12, et même 24 heures.

5) La température d'incubation du virus joue un rôle important dans la reproductibilité de la méthode : 37° C pour le virus Sindbis, 35° C pour la Vaccine, 42° C pour le virus de la maladie de NEWCASTLE.

6) La durée d'incubation peut être variable selon le virus : le virus Sindbis provoque l'apparition de toutes les plages qui doivent se former en 48 heures tandis que le virus vaccinal ne donne de résultats définitifs qu'

après cinq jours de séjour à l'étuve.

En tenant compte de ces quelques impératifs, nous avons là une méthode très sûre et très fidèle, utilisable dans tous les cas où se manifeste un effet cytopathogène direct et même, dans tous les cas où le virus non cytopathogène par lui-même, est capable d'interférer avec un virus cytopathogène.

ESSAIS DE QUELQUES SUBSTANCES ANTIVIRALES

Nous avons cherché à appliquer cette méthode générale à l'étude des substances anitivirales. Les protocoles des essais peuvent varier à l'infini à partir de cette technique de base. Nous avons retenu les plus faciles à mettre en oeuvre pour des essais de routine visant à rechercher dans des séries variées de substances la présence ou l'absence de propriétés antivirales et à chiffrer cette activité si elle existe.

A ce propos, nous pensons que la méthode des gradients de concentration, définissant l'activité limite d'une substance représente la première épreuve à réaliser. Pour cela, nous choisissons trois doses en progression logarithmique. Si la plus forte ne montre aucune inhibition des plages, le produit est très probablement inactif. Dans le cas où se manifeste une inhibition, l'épreuve est recommencée avec une dose plus proche de l'activité décelée.

Pour la détermination de l'activité virulicide et virustatique, les techniques que nous avons choisies ne sont pas les seules valables, et nous ne prétendons pas qu'elles donnent plus de renseignements que d'autres. En particulier, elles ne permettent pas de savoir si, l'inhibtion observée est imputable à l'absence de virus (mort du virus), à la disparition de l'effet cytopathogène seul avec conservation des autres propriétés du virus vivant (y compris le pouvoir infectieux), à l'association de ces deux phénomènes, ou à une virustase temporaire, qui n'empêcherait nullement la multiplication du virus transporté sur une autre culture cellulaire frafche.

De même, comme nous l'avons déjà remarqué à propos des substances qui semblent favoriser la formation des plages, nous ne saurions affirmer

qu'il s'agit là d'une plus grande multiplication virale. L'augmentation du nombre de plages observée peut être attribuée soit à une réelle prolifération plus grande du virus, soit à la stimulation de l'effet cytopathogène, soit à la révélation de l'effet cytopathogène de mutants incapables de la manifester dans les conditions habituelles de la technique utilisée. Il ne faut d'ailleurs pas oublier que dans une population virale, le nombre de particules infectieuses est très inférieur au nombre de particules total et ceci dans des proprotions variables avec l'espèce.

Pour répondre à ces deux séries de questions il faudrait titrer le virus restant après chaque essai, tant au point de vue du pouvoir infectieux que du pouvoir cytopathogène, ce qui nécessiterait un nombre d'expériences incalculable.

Les techniques que nous avons retenues sont beaucoup plus simples.

L'activité virulicide est déterminée en mettant en contact pendant une heure la suspension virale à la concentrtaion souhaitée et la substance en proprotions croissantes choisies de part et d'autre de l'activité limite déjà déterminée, puis en inoculant le mélange à la culture cellulaire ou à l'oeuf incubé.

L'activité virustatique est mesurée en inoculant la substance à la culture cellulaire ou à l'oeuf incubé aux mêmes doses que précédemment, et en apportant après une heure d'incubation à 37° C la même quantité de virus que dans le lot de cultures témoins.

RESULTATS OBTENUS

Rappelons brièvement les résultats obtenus avec les diverses catégories de substances.

LES ENZYMES : semblent avoir des propriétés trop variables et soumises à trop d'influences multiples pour permettre une utilisation valable.

LES ANTIBIOTIQUES : la Mitomycine, seule étudiée ici, se comporte différemment selon le virus en cause. Ce phénomène est à rapprocher du fait que cette substance est à la fois un antibiotique et un agent mutagène particulièrement actif.

LES ANTIMETABOLITES : représentent une immense famille intéressante à des points de vue divers.

Parmi les antimétabolites des protéines, nous avons étudié la para-fluorophénylalanine. Nous n'avons pas retrouvé par nos méthodes la spécificité pour les virus à ARN remarquée par divers auteurs et attribuée à une action au niveau de l'ARN-polymérase. Au contraire, l'activité s'est révélée identique vis à vis du virus Sindbis et du virus vaccinal in vitro, nulle in ovo sur le virus de la maladie de NEWCASTLE.

Parmi les analogues des bases pyrimidiques, nous avons étudié dans la série des azadérivés l'Azauridine et l'Azacytidine. Ces deux substances présentent une activité comparable en tous points. Ce résultat ne peut nous surprendre puisque, en fait, c'est le même métabolite dérivé de ces produits l'acide aza-5-orotique, qui est l'antimétabolite vrai. Par contre, l'absence totale d'activité sur les virus à ARN, tant in vitro qu'in ovo, est assez inattendue. En effet, l'uracile et la cytosine sont toutes deux des bases que l'on retrouve dans les acides ribonucléiques.

Parmi les pyrimidines halogénées, nous avons étudié le Fluoro-5-uracile, l'Iodo 5 uridine, l'Iodo 5 désoxyuridine et la Bromo 5 désoxy 2' uridine. Les activités de ces différents dérivés sont loin d'être comparables et malgré le petit nombre de produits essayés, nous pensons pouvoir établir quelques remarques sur la relation structure-activité.

En suivant l'ordre indiqué ci-dessus (ordre de complexité croissante) nous voyons que l'activité limite se manifeste pour une dose de plus en plus faible. En d'autres termes, les substances deviennent de plus en plus actives, mais sans importantes modifications du coefficient thérapeutique. La spécificité vis à vis des virus à ADN croît dans le même sens.

In ovo, sur le virus de la maladie de NEWCASTLE, cette série ne montre aucun effet.

Dans la série des analogues des sucres, le Cytosine-Arabinoside semble présenter les mêmes avantages que les pyrimidines halogènées liées au désoxyribose mais avec une toxicité partiquement nulle. Cette substance semble d'autant plus intéressante que les virus (Herpès, Vaccine) ne développent pas de résistance croisée envers l'iododésoxyuridine et le cytosine ara-

binoside.

In ovo, l'activité est différente selon que le virus possède un ARN ou un ADN.

Les autres inhibiteurs de synthèse des acides nucléiques représentent une famille trop hétérogène pour permettre d'avancer une conclusion globale.

Les dérivés du benzimidazole étudiés nous ont montré toutes les manifestations possibles d'activité antivirale. Cette série de substances assez toxiques pourtant, semble intéressante car certains dérivés agissent efficacement sur les virus à ARN, les plus difficiles à toucher. Mais elle nécessite un diagnostic assez précis car, selon les cas ces produits favorisent ou inhibent l'expression du pouvoir cytopathogène.

L'A. B. O. B. et l'Amantadine sont des cas trop particuliers pour que nous évoquions ici d'autres propriétés que leur spécificité.

Quant aux dérivés des substances antibactériennes, en dehors de la Méthyl-Isatine-thio-semi-carbazone, spécifique des Pox Virus, il s'agit de produits aisément utilisables en désinfection et stérilisation plus qu'en thérapeutique, actifs cependant dans les mêmes limites in Ovo et in Vitro, sur virus à ADN et à ARN.

Il semble que l'on puisse schématiser en trois groupes l'activité de toutes ces substances :

- Actives sur virus à ARN et à ADN dans des proprotions assez voisines (souvent assez toxiques) utilisables pour la désinfection et la stérilisation.

- Préférentiellement actives sur les virus à ARN (en général parce qu'elles inhibent l'ARN-polymérase)

-Préférentiellement actives sur les virus à ADN. C'est le cas le plus général. Mais il arrive que la spécificité soit très étroite (MIBT, Vaccine, IUdR ou CA-Herpès et Vaccine; etc).

Il y a en effet deux façons de concevoir la recherche d'une substance antivirale.

La première consiste à rechercher un produit universellement actif ou tout au moins actif sur plusieurs virus ou groupes de virus. L'avantage

de ce produit idéal est évident : il ne serait pas nécessaire d'isoler ni de typer le virus (ce qui est le fait de laboratoires très spécialisés) avant d' instaurer un traitement. L'inconvénient en découle : si le produit est très actif sur divers virus, il y a une forte probabilité pour qu'il soit toxique pour l'hôte.

La deuxième orientation de recherche consiste à découvrir l'antiviral spécifique de chaque virus. L'avantage est évidemment la posologie très sûre, l'inconvénient est toujours le diagnostic précis et précoce, qui ne pourra généralement être réalisé qu'en période d'épidémie et non pour des ces isolés.

Les efforts se poursuivent dans les deux directions et déjà se dessinent quelques résultats encourageants, surtout dans le cadre du deuxième groupe : - Amantadine vis à vis de la Grippe A_2

- Thiosemicarbazone vis à vis de la variole et autres Poxvirus
- IUdR, CA, vis à vis des Herpes et des Poxvirus

Quant au premier groupe, il s'agrandit chaque jour d'une nouvelle substance soit plus active, soit moins toxique que les précédentes.

Il semble que ce soit parmi les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques, antimétabolites ou non que s'oriente la recherche antivirale actuelle. Leur usage commence d'ailleurs à se répandre, bien que leur synthèse soit encore difficile et leur manipulation délicate du fait de l'activité toxique inévitable pour les cellules normales de l'hôte.

BIBLIOGRAPHIE

1. - ACKERMANN (W.W.), RABSON (A.), KURTZ (H.).
Growth characteristics of poliomyelitis virus in Hela cell cultures ; lake of parallelism in cellular injury and virus increase.

2. - ACKERMANN (W.W.), MAASAB (H.F.).
Growth characteristics of influenza virus ; biochemical differenciation of stages of development.
J. Exptl. Med., 1955, 102, 393-402.

3. - AGOL (V.I.). CHUMAKOVA (M.Y.).
An agar polysaoccharide and d marker of poliovirus.
Virology, 1962, 17, 221-223.

4. - AGOL (V.I.). CHUMAKOVA (M.Y.).
Effect of polyanions on the multiplication of two variants of poliovirus.
Acta Virol. (Bratislava), 1963, 7, 97-106.

5. - AMBELLAN (E.), HOLLANDER (V.P.).
The role of ribonuclease in regression of lymphosarcoma P 1798.
Cancer Res., 1966, 26, 903-909.

6. - AMSTEY (M.S.), PARKMAN (P.D.).
Enchancement of polio RNA infectivity by dimethylsulfoxide.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1966, 123, 438.

7. - APPLEYARD (G.), HUME (V.D.M.), WESTWOOD (J.C.N.).
The effect of thiosemicarbazone on the growth of rabbit pox virus in tissue culture.
In "Antiviral Substances".
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 130, 92-104.

8. - BAUER (D. J.) ST-VINCENT (L.), KEMPE (C. H.), DOWNIE (A. W.).
Prophylactic treatment of small pox contacts with N methyl isatin bêta thiosemicarbazone compound 33 T 57, Marboran.
Lancet, 1963, 2, 494-496.

9. - BAUER (D. J.).
Monocyclic thiosemicarbazones as antiviral agents.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 105-109.

10. - BAUER (D. J.).
Clinical experience with the antiviral drug MARBORAN, 1 methyl isatin-3-thiosemicarbazone.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 110-117.

11. - BARON (S.), PORTERFIELD (J. S.), ISAACS (A.).
The influence of oxygenation on virus growth.
I. effect on plaque formation by different viruses.
Virology, 1961, 14, 444-449.

12. - BAYLOR (M. B.), EGYUD (L. G.).
The effect of methyl-glyoxal on phage infection of E. coli.
Virology, 1967, 59, 380-382.

13. - BEDSON (H. S.), DUMBELL (K. R.).
The effect of temperature on the growth of pox viruses in chick embryo
J. Hyg., 1961, 59, 457-469.

14. - BERGMANN (N. W.), FEENEY (R. J.).
Contribution to the study of marine products. XXXII.
The nucleosides of sponges.
J. Org. Chem., 1951, 16, 981.

15. - BLOUGHT (H. A.).
Selective inactivation of biological activity of myxovirus by glutaraldehyde.
J. Bact., 1966, 92, 266-267.

16. - BODIAN (D.).
Simplified method of dispersion of monkey cells with trypsin.
Virology, 1956, 2, 575-576.

17. - BONDI (A.), Jr., SPAULDING (E.H.), SMITH (D.E.), DIETZ (C.C.).
Routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics.
Am. J. Med. Sci., 1947, 213, 221-225.

18. - BONIFAS (V.), SCHLESINGER (R.W.).
Nutritional requirements for plaque production by adenovirus.
Fed. Proc., 1959, 18, 560.

19. - BORICK (P.M.), DONDERSHINE (F.H.), CHANDLER (V.L.).
Alcalinised glutaraldehyde, a new antiviral agent.
J. Pharm. Sci., 1964, 53, n° 10, 1273-1275.

20. - BOYER (P.D.), LARDY(H.), MYRBACK (K.).
The enzymes.
Vol. IV 1959-1963, N.Y. Acad. Press.

21. - BOYLAND (E.), RHODEN (E.).
The distribution of urethane in animal tissues as determined by a micro-diffusion method and the effects of urethane treatment on enzymes.
Biochem. J., 1949, 44, 528-531.

22. - BRANMER (K.W.), Mc DONALD (C.R.), TUTE (M.S.).
Antiviral properties of 1-phenoxymethyl 3-4 dihydro and 1, 2, 3, 4, tetrahydroisoquinoleines.
Nature, 1968, 219, 515-517.

23. - BREEZE (D.C.).
Comparative growth and selection of small plaque and large plaque encephalomyocarditis virus in the absence of inhibitor from agar.
J. Gen. Virol., 1967, 1, 71-80.

24. - BROWN (A.), OFFICER (J.E.).
Replication of virus plaques.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1961, 107, 790-795.

25. - BROWN (A.).
Differences in maximum and minimum plaque-forming temperatures among selected group A arborviruses.
Virology, 1963, 21, 362-372.

26. BROWN (D.M.), TODD (A.R.), VARADARAJAN (S.).
Nucleotides, part XXXVII.
The structure of uridylic acid a and b and a synthesie of spongomidine (3 bêta D-arabino furanosyluracil).
J. Chem. Soc., 1956,

27. - BROWN (L.N.), PACKER (R.A.).
Some factors affecting plaque size of Western Equines Encephalomyolitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1964, 25, 487-495.

28. - BROWNLESS (K.A.), DELVES (C.S.), DORMAN (M.), GREEN (C.A.), GRENFELL (E.), JOHNSON (J.D.A.), SMITH (N.).
Biological essay for streptomycin by a modified cylinder plate method.
J. Gen. Microbiol., 1948, 2, 40-53.

29. - BRYAN (C.E.), SKIPPER (H.E.), WHITE (L.) Jr.
Carbamates in the chemotherapy of leucemia. IV. The distribution of radioactivity in tissues of mice following injection of carbamyl labelled urethane.
J. Biol. Chem., 1949, 177, 941-950.

30. - BUCKNALL (R.A.).
The effect of substituted benzimidazoles on the growth of viruses and the nucleic acid metabolism of host cells.
J. Gen. Virol., 1967, 1, 89-99.

31. - BUSH (J. A.).
Stabilisation of trypsin in ointment bases.
J. Pharm. Sci., 1962, 51, 697.

32. - BUSSEL (R. H.), KARZON (D. T.).
Canine distemper virus in chick embryo cells culture. Plaque assay growth stability.
Virology, 1962, 18, 589-592.

33. - BUTHALA (D. A.).
Cell cultures studies on antiviral agents. I action of C. A. and some comparison with 5 I U d R.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1964, 115, 69-77.

34. - BUTHALA (D. A.).
Experience gained in screening for synthetic antiviral compounds.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 17-23.

35. - CALABRESI (P.), CARDOSO (S. S.), FINCH (S. C.), KLIGERMAN (M. M.), Von ESSEM (C. F.), CHU (M. Y.), WELCH (A. D.).
Initial studies with 5 iodo 2' deoxyuridine.
Cancer Res., 1961, 25, 550-559.

36. - CALIGURI (L. A.), EGGERS (H. J.), NOBUKO (L.), TAMM (L.).
Single cell study of chemical inhibition of enterovirus multiplication.
Virology, 1965, 27, 551-558.

37. - CARDELHAC (P. T.), COHEN (S. S.).
Some metabolic properties of nucleotides of 1 bêta d arabino-furano-syl-cytosine.
Cancer Res., 1964, 24, 1595.

38. - CASSAGNE (H.).
Milieux de culture, 2 vol.
Ed. de la Tourelle. St MANDE 1961.

39. - CASALS (J.), OLITSKY (P.K.).
Inactivation of certain neurotropic viruses in vitro by serum lipids.
Science, 1947, 106, 267-268.

40. - CHANG (C.), M.S. Thesis Purdue University, Indiana, 1968.

41. - CHANG (C.Y.), SIMON (E.).
The effect of dimethylsulfoxide on cellular systems.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1968, 128, 60-66.

42. - CHOUROULINKOV (I.), RIVIERE (M.R.), GUERIN (M.).
Etude du développement d'adénomes pulmonaires chez des souris de souches variées après traitement par l'uréthane associé aux rayonsX.
C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 234-237.

43. - CHU (M.Y.), FISCHER (G.A.).
A proposed mechanism of action of 1 bêta D-arabino-furanosyl-cytosine as inhibitor of the growth of leukemic cells.
Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 423-430.

44. - COCHRAN (K.W.).
Studies on the antiviral activity of amantadine hydrochloride.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 130, 432-439.

45. - CODEX Medicamentarius gallicus.
Pharmacopée française VIIIème édition.
1965. Ordre National des Pharmaciens.

46. - COLTER (J.S.), DAVIES (M.A.), CAMPBELL (J.B.).
Studies of three variants of mengo-encephalomyelitis virus. II. Inhibition of interaction with L cells by an agar inhibition and by protamine.
Virology, 1964, 24, 578-585.

47. - CONN (H.J.).
Biological stains.
The WILLIAMS & WILKINS C°, Baltimore 1961.

49. - COOPER (P. D.).
A method for producing plaques in agar suspensions of animal cells.
Virology, 1955, 1, 397-401.

49. - CUMMINGS (D. J.), CHAPMAN (V. A.), DELONG (S. S.).
Discruption of T-even bacteriophages by dimethyl sulfoxide.
J. Virol., 1968, 2, 610-620.

50. - CUSUMANO (C. L.).
Effect of amantadine hydrochloride on rubella virus in tissue culture and in ferrets abstracted.
Bact. Proc., 1965 p 119.

51. - CUTTING (W.), FURST (A.).
Antiviral chemotherapy. Current status.
Antibiotics, 1958, sept. 441-445.

52. - DAMASKUS (C. W. F.), BRADFORD (P. E.).
Stabilising trypsin solutions.
Brit., 1962, 115, n° 4, 900.

53. - DE BOCK (C. A.), BRUG (J.), WALOP (J. W.);
Antiviral activity of glyoxals.
Nature, 1957, 179, 706-707.

54. - DELAMORE (I. W.). PRUSOFF (W. H.).
Effect of 5 iodo 2' deoxyuridine on the biosynthesis of phosphorylated derivatives of thymidine.
Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 101-112.

55. - DE MAEYER (E.), de SOMER (P.).
Influence of pH on interferon production and activity.
Nature, 1962 194, 1252-1253.

56. - DE MAEYER (E.), SCHONNE (E.).
Starch gel as an overlay for the plaque assay of animal viruses.
Virology, 1964, 24, 13-18.

57. - DE RUDDER (J.), PRIVAT de GARILHE (M.P.).
Inhibitory effect of some nucleosides on the growth of various human viruses in tissus culture.
5th interscience conference of antimicrobial agents and chemotherapy, 4th inter. Congress. Chemotherapy, Washington 17-21 oct. 1965.

58. - DE RUDDER (J.), PRIVAT de GARILHE (M.P.).
Une nouvelle série de composés doués de propriétés antitumorales, les nucléosides de l'Arabinose.
Pathol. Biol., 1966, 14, 369-385.

59. - DE SOMER (P.), PRINZIE (A.).
Poliomyelitis virus neutralizing antibodies determination by filter paper discs on solidified bottle cultures.
Virology, 1957, 4, 387-388.

60. - DOMACK (G.), BEHNISCH (R.), MIETZSCH (F.), SCHMIDT (H.).
Uber eine neue gegen tuberkelbasillern in vitro wirksame verbindungs Klasse.
Naturwissen schaften, 1946, 33, 315.

61. - DOMACK (G.).
Investigation on the antituberculose activity of thiosemicarbazones in vitro and in ovo.
Ann. Rev. Tuberc., 1950, 61, 8-19.

62. - DREES (O.).
Evaluation of virucidal properties of disinfectants.
Proc. 6th Intern . Congress. Microbiol. Standardization, 1960, p 370.

63. - DULBECCO (R.).
Production of plaques in monolayer tissue culture by single particules of animal viruses.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1952, 38, 747-752.

64. - DULBECCO (R.), VOGT (M.J.).

Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.
J. Exp. Med., 1954, 99, 167-182.

65. - DULBECCO (R.), VOGT (M.), STRICKLAND (A.G.R.).
A study of the basic aspects of neutralisation of two animal viruses, Western Equine Encephalitis virus and Poliomyelitis virus.
Virology, 1956, 2, 162-205.

66. - EAGLE (H.).
Nutrition needs of mammalian cells tissue culture.
Science, 1955, 122, 501-504.

67. - EASTERBROOK (K.B.).
Interference with the maturation of vaccinia virus by isatin bêta thiosemicarbazone.
Virology, 1962, 17, 245-251.

68. - EGGERS (H.J.), TAMM (I.).
Spectrum and characteristics of the virus inhibitory action of hydroxybenzylbenzimidazole.
J. Exp. Med., 1961, 113, 657-682.

69. - EIDINOFF (M.L.), BATES (B.), STEINGLASS (M.).
Requirements for DNA synthesis in the proliferation of Rous sarcoma virus.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1965, 6, 17.

70. - ELLEM (K.A.O.), COLTER (J.S.).
The interaction of infections ribonucleic acid with mammalian cells line. I. Relationship between osmotic preasure of the medium and the production of infections centers.
Virology, 1960, 11, 434-443.

71. - ENDERS (J.F.), PEEBLES (T.C.).
Propagation in tissue culture of cytopathogenic agents from patient with Measles.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1954, 86, 277-281.

72. - ENGLE (C.G.), LEE (O.G.).
Studies on chemotherapy of viral infections III. Antiinfluenza activities of glyoxal analogs in vitro and in chick embryo systems.
J. Immunol., 1962, 89, 531-538.

73. - EVANS (J.S.), MUSSER (E.A.), MENGEL (G.D.), FARSBLOD (K.R.). HUNTER (J.H.).
Antitumor activity of 1 bêta D-arabine-furanosyl-cytosine hydrochloride.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1961, 350-353. 106.

74. - EVANS (J.S.), MUSSER (E.A.), BOSTWICK (L.), MERGEL (G.D.).
The effect of 1 bêta D-arabino-furanosyl-cytosine hydrochloride on murine neoplasms.
Cancer Res., 1964, 24, 1285.

75. - FARIS (H.A.).
Neutral red and Janus Green as histological stains.
Anat. Record., 1924, 21, 241-244.

76. FISHER (H.W.), PUCK (T.), SATO (G.).
Molecular growth requirements of single mammalian cells.
The action of fetuin in promoting cell attachment to glass.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1958, 44, 4-10.

77. - FOLIGUET (J.M.), SCHWARTZBROD (L.).
Les possibilités et les limites actuelles de la thérapeutique antivirale.
Bull. Assoc. Diplômés. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1965, 98, 8-17.

78. - FOX (J.J.), YUNG (N.), BENDICH(A.).
Pyrimidine nucleosides. II. The synthesis of 1 bêta D-arabine-furanosylthymine ("spongo-thymidine").
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2775.

79. - FRANKLIN (R.H.), HENRY (C.).
The multiplication of fowl plagne virus in tissue cultures of chick embryo cells.
Virology, 1960, 10, 406-418.

80. - GAVIN (J.J.).
Microbiological process report analytical microbiology. II. The diffusion methods.
Applied Microbiol., 1957, 5, 25-33.

81. - GERMAN (A.), PANOUSE-PERRIN (J.), PAUTY (A.M.).
Emploi des cultures de fibroblastes d'embryons de poulets pour l'étude de l'action cytotoxique de quelques médicaments.
Ann. Pharm. Franç., 1961, 29, 633-647.

82. - GERMAN (A.), PANOUSE-PERRIN (J.), QUERO (A.M.).
Etude de l'interféron.
Modalités d'obtention de l'interféron en oeufs de poule incubés sous l'influence du virus de la maladie de Newcastle vivant et inactivé (U.V.).
Ann. Pharm. Franç., 1965, 23, 429-443.

83. - GERMAN (A.), PANOUSE-PERRIN (J.), QUERO (A.M.).
Obtention de l'interféron en oeufs de poule incubés sous l'influence du virus de la maladie de Newcastle vivant et inactivé (ultra-violet).
C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 595-597.

84. - GERMAN (A.), PANOUSE-PERRIN (J.), ZEKAM (J.), DANSE (M. J.).
Utilisation du phénomène des lyses alternées de staphylococcus pyogènes aureus (Twort) pour l'étude des substances antivirales.
Ann. Pharm. Franç., 1967, 25, 783-796.

85. - GIFFORD (G.E.), KLAPPER (D.G.).
Enhancement of vaccinia virus plaque formation by trypsin.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1967, 126, 515-517.

86. - GOMEZ (J.R.), ISAACS (A.).
Optimal temperature for growth and sensitivity to interferon among different viruses.
Virology, 1963, 19, 1-7.

87. - GRENFELL (E.), LEGGE (B.J.), WHITE (T.).
Microbiology of submerged cultures of Penicillium chrysogenum.
J. Gen. Microbiol., 1947, 1, 171,185.

88. - GROSSGEBAUER (K.).
Assessment of virulicid ability of chemical disinfectants.
Appl. Microbiol., 1967, 15, n°2, 316-318.

89. - GWATKIN (R.B.L.), SIMINOVITCH (L.).
Multiplication of single mammalian cells in a non bicarbonate medium.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1960, 102, 718-721.

90. - HADDOW (A.), SEXTON (W.A.).
Influence of carbamic esters (urethane) on experimental animal tumores.
Nature, 1946, 157, 500-503.

91. - HAMRE (D.), BERNSTEIN (J.), DONOVICK (R.).
Activity of p. amino benzaldehyde 3 thiosemicarbazone on vaccinia virus in the chick embryo and in the mouse.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1950, 75, 275-278.

92. - HÁNA (L.), STYK (B.).
An attempt to differentiate bêta inhibitor from co-factor occuring in bovine serum.
Acta. Virol., 1962, 6, 77-83.

93. - HANDSCHUMACHER (R.E.), PASTERNACK (C.A.).
Inhibition of orotidylic acid decarboxylase, a primary site of carcinostasis by 6 azauracil.
Biochim. Biophysica Acta., 1958, 30, 451-454.

94. - HANDSCHUMACHER (R.E.), WELCH (A?D?).
Agents which influence nucleic acid metabolism.
The nucleic acids : CHARGAFF (E.), DAVIDSON (J.N.), Academic Press (N.Y.., London), 1960, III, 453.

95. - HANDSCHUMACHER (R. E.).
Orotidylic acid decarboxylase : inhibition studies with azauridine 5'-phosphate.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 2917-2919.

96. - HANNOUN (C.), PANTHIER (R.).
Application de la méthode des plages en culture cellulaire à l'étude du virus du vaccin amaril 17 D.
Bull. Soc. Path. Exotique, 1960, 53, 424-430.

97. - HANNOUN (C.), ASSO (J.), ARDOIN (P.).
Mutants à petites plages du virus SINDBIS.
Ann. Institut Pasteur, 1964, 107, 598-603.

99. - HARTER (D. H.), CHOPPIN (P. W.).
Plaque assay of Visnia virus using a secondary cellular overlay as an indicator.
Virology, 1967, 31, 176-178.

99. - HEIDELBERGER (C.), LIEBMAN (K. C.), HARBERS (E.).
The comparatives utilisation of uracil 2 C^{14} by liver, intestinal mucosa and Flexner-Jobling carcicoma in the Rat.
Cancer Res., 1957, 17, 199-404.

100. - HEIDELBERGER (C.).
Nucleic acid synthesis and mechanism of action of fluoropyrimidines.
In "Biological approaches to cancer therapy".
R. J. C. HARRIS, 1961, Academic Press (N. Y.), 47.

101. - HEIDELBERGER (C.).
Biochemistry and cancer chemotherapy. IIIrd inter. Congress of chemotherapy, 22-27 july 1963, Stuttgart, 1964, GEORG Thieme Verlag, Stuttgart, I, 24.

102. - HEIDELBERGER (C.).
Biological approach to cancer chemotherapy. IIIrd intern. Congress of chemotherapy 22-27 july 1963, Stuttgart, 11, 939.

103. - HENDERSON (J.R.), TAYLOR (R.M.).
Arthropod-borne virus plaques in agar overlaid tube cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 101, 257-259.

104. - HENDERSON (J.R.), TAYLOR (R.M.).
Propagation of certain arthropod-borne viruses in avian and primate cell culture.
J. Immunol., 1960, 84, 520-528.

105. - HENDERSON (J.R.).
Applications of primary cells cultures in the study of animal viruses. Variations in host responses to infection by certain arthropod-borne viruses.
Yale J. Biol. Med., 1961, 33, 350-258.

106. - HENDERSON (E.S.), BURGEL (P.J.).
Clinical experiences with cytosine arabinoside.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1965, 6, 26.

107. - HERRMANN (E.C.), Jr, GABLIKS (J.), ENGLE (C.), PERLMAN (P.L.).
Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1960, 103, 625-628.

108. - HERRMANN (E.C.).
Plaque inhibition test for detection of specific inhibitor of DNA containing viruses.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1961, 107, 142-145.

109. - HERRMANN (E.C.).
Plaque inhibition test for detection of specific inhibitor of DNA containing viruses.
Proc. Soc . Exp. Biol., 1962, 109, 251-252.

110. - HO (M.), BREINIG (M.K.).
Conditions for the production of an interferon appearing in chick cell cultures infected with sindbis virus.
J. Immunol., 1962, 89, 177-186.

111. - HOLLAND (J. J.), Mc LAREN (L. C.).
Improved method staining cell monolayers for virus plaque counts.
J. Bacteriol., 1959, 78, 596-597.

112. - HOTCHIN (J. E.).
Use of methyl cellulose gel as a substitute for agar in tissue culture overlays.
Nature, 1955, 175, 352.

113. - HUMMELER (K.), WECKER (E.).
Influence of p. fluorophenylalamine on polio virus particules.
Virology, 1964, 24, 456-460.

114. - HUNTER (J. H.).
Pyrimidine nucleosides and process.
V. S. Patent n°3.116.282. Patent ed., 1963, 31.

115. - INOUE (K. Y.), MASAATSY (Y.).
Studies on Japanese Encephalitis virus.
Virology, 1962, 18, 500-501.

116. - JASINKA (S.), LINK (F.), BLAŠKOVIČ (D.), RADA (B.).
Studies on the effect of antiviral substances on experimental virus infections. III. The effects of 6 azauracil riboside and urethane on vaccinia virus infection in mice.
Acta Virol., 1962, 6, 17-24.

117. - KAPLAN (M. M.), WECKER (E.), FORSEK (Z.), KOPROWSKI (H.).
An indicator plaque forming system for demonstration of interference by non cytological strain of rabbies virus.
Nature, 1960, 186, 821-822.

118. - KATZ (L.), PENMAN (S.).
The solvent denaturation of double stranded RNA from polio-virus infected Hela.
Biochem. Biophyso. Res. Commun., 1966, 23, 557-560.

119. - KAUFMAN (H. E.).
Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5 iodo 2' deoxyuridine.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1962, 109, 251-252.

120. - KAUFMAN (H. E.), NEUBURN (A. B.), MALONEY (E. D.).
IDU therapy of herpes simplex.
Arch. Ophtal. Chicago, 1962, 67, 583-591.

121. - KAUFMAN (H. E.), MALONEY (E. D.).
IDU et CA in experimental herpetic keratitis.
Arch. Ophtal. Chicago, 1963, 69, 626-629.

122. - KAUFMAN (H. E.), MARTOLA (E. L.), DOHLMANN (C. H.).
Use of 5 iodo 2' deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis.
Arch. Ophtal. Chicago, 1962, 68, 235-239.

123. - KAUFMAN (H. E.).
Chemotherapy of virus infection.
IIIrd intern. Congress of chemotherapy, 22-27 july 1963, Stuttgart.
1964, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, I, 743.

124. - KAUFMAN (H. E.).
Chemotherapy, of virus diseases.
Chemotherapia, 1963, 7, 1-16.

125. - KAUFMAN (H. E.), CAPELLA (J. A.), MALONEY (E. D.), ROBBINS (J. E.), COOPER (G. M.), VOTILA (M. H.).
Corneal toxicity of C. A.
Arch. Ophtal. Chicago, 1964, 72, 535-540.

126. - KAUFMAN (H. E.).
In vivo studies with antiviral agents.
Trans. Pacific. Coast. Oto. Ophtal. Soc., 1965, 46, 103-126.

127. - KLEIN (M.), DEFOREST (A.).
The inactivation of viruses by germicides.
School of Medicine Temple University Philadelphia, p 116-117.

128. - KLEINSCHMIDT (W. J.), ELLIS (L. F.).
Stalolon as an inducer of interferon.
In "Interferon" Ciba foundation symposium.
WOLSTENHOLME (GEN.) and MAEVE O'CONNOR. Ed. London, 1968, p 39-49.

129. - KRAKOFF (I. H.).
Mechanisms of drug action in leukemis.
Am. J. Med., 1960, 28, 735-750.

130. - KUCERA (L. S.), HERRMANN (E. C.) Jr.
Gradient plate technique applied to the study antiviral substances.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1966, 122, 258-262.

131. - LEPINE (P.), SLIZEWICK (P.), DANIEL(P.), PACCAUD (M.).
Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 654-656.

132. - LEPINE (P.).
Techniques de laboratoire en Virologie humaine.
Masson et C^{ie} Ed. Paris, 1964, 831 p.

133. - LEPINE (P.).
Thérapeutique d'aujourd'hui et de demain : les maladies à virus.
Thérapie, 1967, XXII n° 4 bis, CXXV-CXXXIX.

134. - LEVINTOW (L.), DARNELL (J. E.) Jr.
Effects of p. fluorophenylalanine on poliovirus replication.
Fed. Proc., 1961, 20.

135. - LEVINTOW (L.), THOREEN (M. M.), DARNELL (J. E.), HOOPER (J. L.).
Effect of p. fluorophenylalanine and puromycin on replication of poliovirus.
Virology, 1962, 16, 220-229.

136. - LIBIKOVA (H.), VILCEK (J.).
Assay of tick-borne encephalitis virus in Hela cells. I. Cytopathic

effect and metabolic inhibition.
Acta Virol., 1960, 4, 165-171.

137. - LIEBHABER (H.), TAKEMOTO (K. K.).
Alteration of plaques morphology of EMC virus with polycations.
Virology, 1961, 14, 502-504.

138. - LINDENMANN (J.), GIFFORD (G. E.).
Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon.
I Dynamics of plaque formation by vaccinia virus.
Virology, 1963, 19, 283-293.

139. - LINDENMANN (J.), GIFFORD (G. E.).
Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon.
II Dynamics of plaque formation by vaccinia virus in the presence of interferon.
Virology, 1963, 19, 294-301.

140. - LINDEMANN (J.), GIFFORD (G. E.).
Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon.
III A simplified plaque inhibition assay of interferon.
Virology, 1963, 19, 302-309.

141. - LINK (F. D.), BLAŠKOVIČ (D.), RAUS (J.).
Studies on the effect of antiviral substances on experimental virus infection. II Dose response relation-ship between concentration and antiviral effect of urethane in mice.
Acta Virol., 1961, 5, 245-252.

142. - LOO (R. V.), BREENAN (M. J.), TALLEY (R. W.).
Clinical pharmacology of cytosine arabinoside.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1965, 6, 41.

143. - LORENZ (R. J.), ZOETH (B.).
Estimation of the overlap bias in plaque assay.
Virology, 1966, 28, 379-385.

144. - LUDOVIC (P. P.), ASHFORD (C.), MILLER (N. F.).
Studies on chemically induced and spontaneous alteration of morphology and growth potential in human cell culture.
Cancer Res., 1962, 22, 788-796.

145. - LWOFF (A.), DULBECCO (R.), VOGT (M.), LWOFF (M.).
Kinetics of the release of poliomyelitis virus from single cells.
Ann. N. Y. Acad. SCI., 1956, 61, 801-805.

146. - LWOFF (A.), LWOFF (M.).
Remarques méthodologiques à propos de la thermosensibilité du développement viral.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 10, 313-317.

147. - MAASAB (H. F.), COCHRAN (K. W.).
Rubella virus ; inhibition in vitro by amantadine hydrochloride.
Science, 1964, 145, 1443-1444.

148. - Mac GREGOR (W. S.).
The chemical and physical properties of DMSO.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 141, 3-12.

149. - Mac LIMANS (W. J.), UNDERWOOD (G. E.), SLATER (E. A.), DAVIS (E. V.). SIEM (R. A.).
Antiviral activity of dicarbonyle and related compounds in embryonated eggs.
J. Immunol., 1957, 78, 104-111.

150. - Mac PHERSON (I.), MONTAGNIER (L.).
Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus.
Virology, 1964, 23, 291-294.

151. - MAGEE (W. E.), BACH (M. K.).
Biochemical studies on the antiviral activities of the isatin-bêta-thiosemicarbazones.
In "Antiviral Substance", Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 80-91.

152. - MAYER (V.), SOKOL (F.).
Quantitative plaque assay of infection RNA of EEE virus.
Acta Virol., 1961, 5, 262-267.

153. - MERCIER (J.):
Etude de la pénétration d'acides desoxyribonucléiques dénaturés ou non dans les fibroblastes d'embryon de Poulet en culture "in vitro".
Thèse Doct. Université Paris, 1968.

154. - MOSOLOV (V. V.), LOGINOVA (M. D.).
Dokl. Acad. Nauk SSSR, 1962, 146, 1209-1212.

155. - MUSCHEL (L. H.), SCHMOKER (K.).
Activity of mitomycin C, other antibiotics and serum against lysogenic bacteria.
J. Bacteriol., 1966, 22, 967-971.

156. - NAFICY (K.).
Cyclopin.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 449-459.

157. - NEUMAYER (E. M.). HAFF (R. F.), HOFFMAN (C. E.).
Antiviral activity of amantadine hydrochloride in tissue culture and in ovo.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1965, 119, 393-396.

158. - NOMURA (S.), TAKEMORI (N.).
Mutation of polio-viruses with respect to size of plaque.
Selection of minute plaque mutants of three types of polio-viruses in tissue cultures.
Virology, 1960, 12, 154-170.

159. - PAPAC (R.), CREASEY (W.A.), CALABRESI (P.), WELCH (A.D.).
Clinical and pharmacological studies with 1 D-arabino-furanosyl-cytosine (cytosine-arabinoside).
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1965, 6, 50.

160. - PATERSON (E.), HADDOW (A.), THOMAS (J.), WATKINSON (J.H.).
Leukemia treated with urethane compared with deep X ray therapy.
Lancet, 1946, 1, 677-682.

161. - PAUL (J.).
In "Cell and tissue culture".
Edimburgh and London 1959.
LIVINGSTONE Ltd.

162. - PAUTY (A.M.).
Culture de fibroblastes d'embryons de Poulets.
Application à l'étude de l'action cytotoxique de quelques substances antiseptiques et antivirales.
Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1961.

163. - PENSO (G.).
Activity control of interferon and other antiviral compounds.
Rev. Roum. Inframicrobiol., 1967, 4, n° 1, 75-81.

164. - PEPPER (R.E.), MICH (E.L.), LIEBERMAN (E.R.), SOMERVILLE (N.J.).
Dialdehyde alcoholoc sporocidal composition.
United States Patent Office, 3, 016, 328.
Patented jan. 9. 1962.

165. - PHILLIPS (M.), COHEN (B.).
The preparation of vital neutral red.
Stain Technol., 1927, 2, 74-79.

166. - POINDRON (P.).
Thèse Doct. Etat Pharm. en cours.

167. - PONS (M.W.), PRESTON (W.S.).
The "In vivo" inhibition by bêta-phenylserine of Rabies ; Myxoma, and

Vaccinia viruses.
Virology, 1961, 15, 164-172.

168. - PORTERFIELD (J. S.).
A plaque technique for the titrarion of yellow fever virus and antisera.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1959, 53, 458-466.

169. - PORTERFIELD (J. S.).
Plaque formation with yellow fever and related arthropod-borne viruses.
Nature, 1959, 183, 1067-1069.

170. - PORTERFIELD (J. S.).
Application of the plaque inhibition test to viruses of the tick-borne encephalitis complex.
Symposia of the CZECHOSLOVAK Academy of sciences, 11-14 oct. 1960

171. - PORTERFIELD (J. S.).
A simple plaque inhibition test for study arthropod-borne viruses
Bull. Org. Mond. Sante, 1960, 22, 373-380.

172. - PORTERFIELD (J. S.).
An estimate of the molecular weight of interferon as measured by its rate of diffusion through agar.
Virology, 1960, 12, 197-203.

173. - PORTETFIELD (J. S.), WILLIAMS (M. C.), WOODALL (J. P.).
A plaque technique for the primary isolation of arthropod-borne viruses.
Nature, 1960, 188, 252-253.

174. - PORTERFIELD (J. S.).
Tissue culture technique applied to viruses of the tick-borne encephalitis complex. An approach though the study, of other group B viruses.
Symposia of the CZECHOSLOVAK Academy of sciences 11-14 oct. 1960.

175. - PRIVAT de GARILHE (M.), de RUDDER (J.).
Effet de deux nucléosides de l'arabinose sur la multiplication des virus de l'herpès et de la vaccine en culture cellulaire.

C.R. Acad. Sci. (Paris), 1964, 259, 2725-2728.

176. - PRUSOFF (W.F.), LAJTHA (L.G.), WELCH (A.D.).
Abstr. Am. Chem. Soc., Minneapolis, Meeting p 6 C, 1955.

177. - PRUSOFF (W.H.), LAJTHA (L.G.), WELCH (A.D.).
Effect of the deoxyriboside of 6 azathymine (azathymidine) on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by bone marrow and neoplastic cells in vitro.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 209-214.

178. - PRUSOFF (W.H.).
Studies on the mechanism of action of azathymine. III Relationship between incorporation in to deoxypentose nucleic acid and inhibition.
J. Biol. Chem., 1957, 226, 901-910.

179. - PRUSOFF (W.F.).
Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine.
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 295-296.

180. - PRUSOFF (W.H.), BAKHLE (Y.S.), SEKELY (L.).
Cellular and antiviral effects of halogenated desoxyribonucleosides.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 130, 135-150.

181. - QUERO (A.M.).
Etude de la production d'interféron par les cellules de l'embryon de Poulet "in ovo" et "in vitro" sous l'influence du virus de la maladie de Newcastle vivant et inactivé.
Thèse Doct. Etat Pharm., 1967. Paris.

182. - RADA (B.), BLAŠKOVIČ (D.), SORM (F.), SKODA (J.).
The inhibitory effect of 6 azauracile riboside on the multiplication of vaccinia virus.
Experientia, 1960, 16, 407-488.

183. - RADA (B.), BLAŠKOVIČ (D.).
Inhibition of vaccinia virus multiplication in vitro by 6 azauracil ri-

boside.
Acta Virol., 1961, 5, 308-316.

184. - RADA (B.), BLAŠKOVIĆ (D.).
Some characteristics of the effect of 6 azauridine on vaccinia virus multiplication, in comparison with those 5 iodo-deoxyuridine.
Acta Virol., 1966, 10, 1-9.

185. - RAMMLER (D. H.), ZAFFARONI (A.).
Biological implications of D. M. S. O. based on a review of its chemical properties.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 141, 13-23.

186. - RAO (A. R.), Mc FADZEA (J. A.), KAMALAKS (K.).
An isothiazole thiosemicarbazone in treatment of variola major in man.
Lancet, 1966, 1, 1068-1071.

187. - RAO (A. R.), Mc KENDRT (G. D.), VELAYUDH (L.), KAMALAKS (K.).
Assessment of an isothiazole thiosemicarbazone in prophylaxis of contacts of variola major.
Lancet, 1966, 1, 1072-1075.

188. - RAPP (F.), STEPHENS (J. S.), JAROSS (L.), GORDOH (I.).
Quantitative determination of infections units of Measle virus by counts of immunoflurescent foci.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 101, 289-294.

189. - RAPP (F.).
Variants of herpes simplex virus : isolation, characterization and factors influencing plaque formation.
J. Bacteriol., 1963, 86, 985-991.

190. - REED (L. J.), MUENCH (H.).
A simple method of estimating fifty per cent and points.
Amer. J. Hyg., 1938, 27, 493-497.

191. - RENIS (H. E.), JOHNSON (H. G.).
Inhibition of plaque formation of vaccinia virus by cytosine arabinoside

hydrochloride.
Bact. Proc., 1962, 45, 120.

192. - RICHTER (A.).
Plaque formation with N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthane sulfonic acid. (T.E.S. Buffer).
Appl. Microbiol., 1967, 15, 1507-1508.

193. - RINALDINI (L.M.).
An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells.
Exp. Cell. Res., 1959, 16, 477-505.

194. - ROSEN (L.).
Plaque formation in monolayers of chicken embryo kidney cells.
Virology, 1958, 5, 573-577.

195. - ROUHANDEH (H.).
Comparison of methods for plaque assay of Picorna virus ribonucleic acids.
Virology, 1965, 27, 439-441.

196. - RUHMANN (A.G.), BERLINER (D.L.).
Tissue culture fibroblast. A testing system for steroïdal anti inflammatory activity.
J. Retic. Soc., 1966, 3, 380-384.

197. - RUNTI (C.).
Etat actuel de la chimiothérapie antivirale.
Conférences de 12 octobre 1967.
In Conférences des journées scientifiques des 8 et 9 juin 1968.
p 99-115.
Cercle scientifique des anciens élèves de l'Institut A. Gilkinet. Liège.

198. - SABIN (A.B.).
Amantadine hydrochloride. Analysis of data related to its proposed use for prevention of A_2 influenza virus discease in human Beings.

J. A. M. A., 1967, 200, 943-950.

199. - SCHARFF (M. D.), THOREEN (M. M.), Mc ELVAIN (N. F.) LEVINTOW (L.).
Interruption of polio-virus RNA synthesis by p fluorophenylalamine and puromycin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 127-137.

200. - SCHARFF (M. D.), SUMMERS (D. E.), LEVINTOW (L.).
Further studies on the effect of p fluorphenylalamine and puromycin on polio-virus replication.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 282-290.

201. - SCHMIDT (B.), GROSSGEBAUER (K.)
Gesundheitswesen und Desinfektion.
Instituts for Hygiene and Microbiology of the Free University of Berlin, 1963, 55, 33-47.

202. - SCHREK (R.).
Effect of heat and dimethylsulfoxide on normal and leukaemic lymphocytes.
Lancet, 1965, 2, 1020.

203. - SCHULZE (I. T.), SCHLESINGER (R. W.).
Plaque assay of dengue and other group B arbor viruses with methylcellulose.
Virology, 1963, 19, 40-48.

204. - SCHWACHMAN (H.), PATTERSON (P. R.), LAGUNA (J.).
Studies in pancreatic fibrosis ; a simple diagnostic gelatin film test for stool trypsin.
Pediatrics, 1949, 4, 222-230.

205. - SHEFFIELD (F. W.), BAUER (D. J.), STEPHENSON (S. M.).
The protection of tissue culture by isatin thiosemicarbazone from the cytopathic effects of certain pox viruses.
Brit. J. Exp. Pathol., 1960, 41, 638-647.

206. - SHEFFIELD (F.W.).
Inhibition of rabbit-pox virus replication by isatin bêta thiosemicarbazone.
Brit. J. Exp. Pathol., 1962, 43, 59-66.

207. - ŠKODA (J.), SORM (F.).
Antagonism between 6 azauracil and certain pyrimidin derivatives in Escherichia coli.
Collection CZECH. Chem. Commun., 1956, 21, 1328-1331.

208. - ŠKODA (J.).
In "Protein Biosynthesis".
HARRIS (R.J.C.) Ed. Academie Press. N.Y. London, 1961. p 185.

209. - ŠKODA (J.).
Mechanism of action and application of azapyrimidine.
In "Progress in nucleic acid research".
DAVIDSON (J.N.), COHN (W.E.) Ed academie Press. N.Y. London, 1963, t 2, p 197.

210. - SORM (F.), SKODA (J.).
6 azauracil, an antimetabolite of uracil and cytosine in Escherichia coli.
Collection CZECH. Chem. Commun., 1956, 21, 487-490.

211. - SORM (F.), VESELY (J.).
Potentiation of the cancerostatic effect 6 azauridine and 6 azathymine with 5 bis 2 chloroethylaminomethyluracil.
Experientia, 1961, 17, 355-357.

212. - SOROKIN (C.).
Inhibition of cells division by CO_2.
Nature, 1962, 194, 496.

213. - SPENDLOVE (R.S.). SCHAFFER (F.L.).
Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus.
J. Bacteriol., 1965, 89, 597-602.

214. - STANFIELD (F. J.), LYMAN (M. E.).
Microscope examination of cells monolayers grown in plastic bottles.
Nature, 1963, 200, 94-95.

215. - SWIM (H. E.), PARKER (R. F.).
Non bicarbonate buffers in cell culture Media.
Science, 1955, 122, 466.

216. - SZYBALSKI (W.).
Gradient plate technique for study of bacterial resistance.
Science, 1952, 116, 46-51.

217. - TAKEMOTO (K. K.), LIEBHABER (H.).
Interaction virus polysaccharide.
I. an agar polysaccharide determining the plaque morphology of EMC virus.
Virology, 1961, 456-462.

218. - TALLEY (R. W.), VAITKEVICIUS (V. K.), REED (M. L.), BREANAN (M. J.).
Cytosine arabinoside human.
Pharmacology and toxicity.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1962, 3, 366.

219. - TALLEY (R. W.), VAITKEVICIUS (V. K.).
Megaloblastosis produced by a cytosine antagonist : 1 bêta D-arabino-furanosyl-cytosine.
Blood, 1963, 21, 352-362.

220. - TAMM (I.), FOLKERS (K.), SHONK (C. H.), HORSFALL (F. L.).
Inhibition of influenza virus multiplication by N glycosides of benzy-midazoles.
J. Exp. Med., 1954, 99, 227-250.

221. - TAMM (I.).
Enhancement of influenza virus multiplication by methyl 2 d riboben-zimidazole.
Virology, 1956, 2, 517-531.

222. - TAMM (I.).
Selective chemical inhibition of influenza B virus multiplication.
J. Bacteriol., 1956, 72, 42-53.

223. - TAMM (I.), NEMES (M. M.).
Glycosides of polio-virus multiplication.
Virology, 1957, 4, 483-498.

224. - TAMM (I.). EGGERS (H. J.), In "HORSFALL (F. L.), TAMM (I.).
Viral and rickettsial infections of man.
London, 1965, 1250 p. LIPPINCOTT & C° Ed.

225. - TANIGUCHI (S.), TAKEUCHI (H.), YOSHINO (K.).
Unusually large plaque mutant of sindbis virus.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1968, 128, 56-60.

226. - THOMAS (J. A.), BARBEE (J.), COCIOBA (J. D.).
Action du glyoxal sur les acides nucléiques.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1957, 245, 1182-1184.

227. - THOMAS (J. A.), DEYSSON (G.).
Action chromatoclassique du glyoxal.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1957, 245, 735-738.

228. - THOMAS (J. A.), HANNOUN (C.).
Action bactéricide et virulicide du glyoxal.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1957, 244, 2258-2261.

229. - THOMAS (J. A.), HANNOUN (C.).
Analyse de l'action inhibitrice du glyoxal sur la multiplication du virus de la grippe.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1957, 244, 2329-2331.

230. - TIFFANY (B. D.), WRIGHT (J. B.), MOFFET (R. V.), HEINZELMAN (R. V.), STRUBE (R. B.), ASPERGREEN (B. D.), LINCOLN (E. A.), WHITE (J. J.).
Antiviral compounds : aliphatic glyoxals. Hydroxaldehydes and related compounds.
J. Amer. Soc., 1957, 79, 1682-1687.

231. - TIFFANY (B.D.), MOFFET (R.B.), ASPERGREEN (B.D.), HEINZELMAN (R.V.).
Antiviral compounds. Aromatic glyoxals.
J. Amer. Soc., 1957, 79, 1687-1690.

232. - TRUHAČEV (A.A.), SALGANIK (R.J.).
The effect of deoxyribonuclease on the synthesis of DNA of vaccinia virus.
Virology, 1967, 33, 552-555.

233. - TYTELL (A.A.), NEUMANN (R.E.).
A medium free of agar, serum, and peptone for plaque assay of herpes simplex virus.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 113, 343-346.

234. - UNDERWOOD (G.E.), WEED (S.D.).
Glyoxal and related compounds as potential blood srerilizing agents.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1956, 93, 421-424.

235. - UNDERWOOD (G.E.), SIEM (R.A.), GERPHEIDE (J.A.), HUNTER (J.H.).
Binding of antiviral agents (ketoxal) by various metabolites.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 100, 312-315.

236. - UNDERWOOD (G.E.).
Activity of 1 bêta D-arabino-furanosyl-cytosine hydrochloride against herpes simplex keratitis.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1962, 111, 660-664.

237. - UNDERWOOD (G.E.).
Chemotherapy of herpes keratitis in rabbits.
IIIrd Intern. Congress of Chemotherapy Stuttgart, 22-27 july 1963, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, 1, 858.

238. - UNDERWOOD (G.E.), WISNER (C.A.), WEED (S.D.).
Cytosine arabinoside (C.A.) and other nucleosides in herpes virus infections.
Arch. Ophtal. Chicago, 1964, 72, 505-512.

239. - URBANO (P.).
The inhibition of polyoma antigen synthesis and capsid formation by 5 fluorodeoxyuridine.
J. Gen. Virol., 1967, 1, 291-295.

240. - VAHERI (A.), PAGANO (J.S.).
Infections poliovirus RNA. A sensitive method of assay.
Virology, 1965, 27, n° 3, 434-436.

241. VILCEK (J.).
Production of interferon by newborn and adult mice infected with sindbis virus.

242. - VISWANATHA (T.), LIENER (I.E.).
The inhibition of trypsin. III. Influence of urea.
J. Biol. Chem., 1955, 215, 777.

243. - VOGT (M.), DULBECCO (R.), WENNER (H.A.).
Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neuropathogenicity.
Virology, 1957, 4, 141-155.

244. - VON MAGNUS (P.).
Propagation of the PR 8 strain influenza A virus in chick embryos. III. The formation of "incomplete" virus following inoculation of large doses of seed virus.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1951, 28, 278-293.

245. - WALLIS (C.), MELNICK (J.L.).
Cl_2Mg enhancement of cell susceptibility to poliovirus.
Virology, 1962, 16, 122-132.

246. - WALLIS (C.), MELNICK (J.L.), BIANCHI (M.).
Factors influencing enterovirus and reovirus growth and plaque formation.
Tex. Rep. Biol. Med., 1962, 20, 693-702.

247. - WALLIS (C.), SMITH (K.O.), MELNICK (J.L.)
Reovirus activation by heating and inactivation by cooling in $MgCl_2$ solutions.
Virology, 1964, 22, 608-619.

248. - WALLIS (C.), MELNICK (J.L.), RAPP (F.).
Effects of pancreatin on growth of reovirus.
J. Bacteriol., 1966, 92, 155-160.

249. - WALTERS (S.), BURKE (D.C.), SKEHEL (J.J.).
Interferon production and RNA inhibitors.
J. Gen. Virol., 1967, 1, 349-362.

250. - WATSON (J.D.), CROCK (F.H.C.).
Molecular structure of nucleic acids.
A structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature, 1953, 171, 737-738.

251. - WECKER (E.), SCHONNE (E.).
Inhibition of viral synthesis by fluorophenylalanine.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 1961, 47, 278-282.

252. - WECKER (E.), HUMELER (K.), GOETZ (O.).
Relationship between viral RNA and viral protein synthesis.
Virology, 1962, 17, 110-117.

253. - WECKER (E.).
Direct inhibition of protein synthesis and its effect upon growth of RNA viruses.
In "Antiviral Substances".
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 130, 259-266.

254. - WEISS (L.).
Studies on cellular adhesion in tissue culture. I. The effect of serum.
Exp. Cell Research, 1959, 17, 499.

255. - WELCH (A. D.), PRUSOFF (W. H.).
A synopsis of recent investigation of 5 iodo 2' deoxyuridine.
Cancer Chemotherapy., 1960, 6, 29-36.

256. - WILLIAMS (T.).
Interval estimates for efficiency of plating.
J. Gen. Virology, 1968, 2, 13-18.

257. - WILSON (J. N.), COOPER (P. D.).
Photodynamic demonstrations of two stages in the growth of poliovirus
Virology, 1962, 17, 195-196.

258. - WINOCOUR (E.), SACHS (L.).
Cell-virus inter actions with the polyoma virus. I. Studies on the lytic inter action in the mouse embryo system.
Virology, 1960, 11, 699-721.

259. - WOOD (D. D.).
The relation of p. aminobenzoïc acid to the mechanism of the action of sulphanilamide.
Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 74-90.

260. - WOOD (T. R.).
Methods useful in evaluating 1 adamantanamin hydrochloride. A new orally active synthetic antiviral agent.
In "Antiviral Substances".
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 419-431.

261. - WOODSON (B.), JOKLIK (W. K.).
Inhibition of vaccinia virus multiplication by isatin bêta thiosemicarbazone.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1965, 54, 946-953.

262. - ZEKAN-TCHENDJEU (J.).
Etude du phénomène des lyses et cultures alternées de staphylococcus aureus Twort par le phage homologue. Application à la recherche de substances antivirales.
Thèse Doct. Etat, Paris, 1967.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

PLAN 5

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

DESCRIPTION GENERALE DE LA METHODE DES PLAGES 9

CHAPITRE II

CULTURE CELLULAIRE DES FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE POULET 15

1. Choix et préparation des embryons 17

2. Trypsination 18

- Préparation de la solution trypsique 18
- Titrage de l'activité trypsique 19
- Temps de trypsination 21
- Température de trypsination 22
- Elimination de la trypsine 24

3. Mise en culture des cellules 25

- Numération des cellules 26

CHAPITRE III

MILIEUX DE CULTURE DE LA COUCHE CELLULAIRE 31

- Préparation des différents milieux étudiés 32
- Traitement des bouchons de caoutchouc 33
- Addition de Bicarbonate de Sodium 34

de Tris 34

d'acide oxalacétique 35

de sérum de veau 35

CHAPITRE IV

RESULTATS COMPARES DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE 37

- Description de l'étuve à atmosphère enrichie en gaz carbonique 39
- Observation des cultures 41
- Coloration 42
- Montage des lamelles 42
- Comparaison des cultures obtenues 42

Aspect macroscopique 42

Aspect microscopique 43

CHAPITRE V

INOCULATION DU VIRUS 47

1. Entretien de la souche de virus SINDBIS 49
   - Milieu de dilution de la suspension virale 50
2. Volume de l'inoculum et inoculation 53
3. Temps d'incubation 54

CHAPITRE VI

MILIEU SOLIDE 55

1. Milieu nutritif liquide 57
   - Extrait embryonnaire 58
   - Vitamines de EAGLE 58
   - Milieu au Bicarbonate de Sodium 60
   - Milieu au Tris 60
   - Milieu à l'acide oxalacétique 60
2. Comparaison des résultats obtenus avec les différents milieux . 62
   - Milieu au T.E.S. 67
3. Milieux gélifiants 68
   - Gélose 69
   - Agarose 70

- Méthyl-cellulose 71
Comparaison à la gélose 72
Essai de différentes concentrations 74
Comparaison à l'agarose 76
- Amidon 76
- Comparaison et conclusion sur le milieu solide 79

CHAPITRE VII

OBTENTION DES PLAGES

Colorants facilitant la lecture
Rouge neutre 83
- Amélioration du contraste
Chlorure 85
Sulfate 85
Calcium 86
Histones 86
- Température de formation des plages 86
- Temps d'incubation 87

CHAPITRE VIII

LECTURE DES RESULTATS 89

Observation 91
Numération 91
Photographies 92

CHAPITRE IX

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE 95

Méthode définitivement adoptée
- Pour la culture cellulaire 97
- Pour l'obtention des plages 98

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DE NOTRE METHODE A L'ESSAI DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE QUELQUES SUBSTANCES 101

CHAPITRE I

TECHNIQUES IN VITRO 105

- Généralités 107
- Entretien de la souche de vaccine 107

Titrage 109

Conservation 110

- Dilution de virus 111

SUBSTANCES ANTIVIRALES 111

INFLUENCE DU SOLVANT 111

- Virus SINDBIS 114
- Virus vaccinal 150

CHAPITRE II

ACTIVITE VIRULICIDE ET VIRUSTATIQUE 117

1. Activité virulicide 119
   - Essais de contact
2. Activité virustatique 122
   - Essais de protection
3. Quelques remarques sur ces méthodes
   - Aspect de la courbe 123
   - Importance de l'inoculum 123

CHAPITRE III

ANTIVIROGRAMME 127

- Disques de papier 130
- Cylindres 131

CHAPITRE IV

GRADIENT DE CONCENTRATION

ou Activité limite 133

CHAPITRE V

TECHNIQUES IN OVO 139

- Entretien de la souche du Virus de la Maladie de NEWCASTLE 141

Titrage

- Activité virulicide 143

Inoculum 144

Lecture et expression des résultats 145

Influence du solvant 145

Exemple de calcul 147

Virus vaccinal 148

Virus grippal P R 8 149

- Activité virustatique 150

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

CHAPITRE I

ESSAI DE CLASSIFICATION DES SUBSTANCES ANTIVIRALES 153

CHAPITRE II

LES ENZYMES 159

CHAPITRE III

LES ANTIBIOTIQUES

- Mitomycine C 163

CHAPITRE IV

LES ANTIMETABOLITES 167

- Rappel de la constitution des acides nucléiques 171
- Antimétabolites des protéines virales
Fluoro-phényl-alanine 172
- Analogue des acides nucléiques
1) Aza-pyrimidine 175
Aza uridine 177
Aza cytidine 180
2) Pyrimidines halogénées 182
Fluoro uracile 184
Iodo-uridine 185
Iodo-désoxy-uridine 187
Bromo-désoxy-uridine 189
3) Analogues des sucres
Les Arabinosides 191
Cytosine-arabinoside in vitro 193
in ovo 194

CHAPITRE V

INHIBITEURS DES ACIDES NUCLEIQUES AUTRES QUE LES ANTIMETABOLITES 195

A) Dérivés du BENZIMIDAZOLE 197
- Formules 199
- Essais réalisés in vitro 199
- Conclusions 210
- Essais in ovo 210
B) Dérivés de la GUANIDINE 211
ABOB - Essais in vitro 212
- Essais in ovo 213
C) AMANTADINE 217
Essais réalisés in vitro 218
in ovo virus de la maladie de NEWCASTLE 219
virus grippal P R 8 220

CHAPITRE VI

DERIVES DES CORPS ET ACTION ANTIBACTERIENNE

1. Uréthane 223

in vitro 224

in ovo 225

2. Dérivés de la thio-semi-carbazone 225

Essais in vitro 227

Essais in ovo 228

3. Glyoxal

Essais in vitro 229

Essais in ovo 231

Conclusion 231

4. Glutaraldehyde

Essais in vitro 232

Essais in ovo 234

5. Quinones

Formules 235

Essais in vitro 236

Essais in ovo 241

Conclusion 242

CONCLUSION 243

BIBLIOGRAPHIE 251

Vu et permis d'imprimer
Paris le 6 Mai 1959
le Doyen

P. MALANGEAU